



Title	AMPKによる心臓微小管の動的不安定性制御の病態生理学的意義の解明
Author(s)	矢白木, 翔平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72617
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士論文

AMPK による心臓微小管の動的不安定性制御 の病態生理学的意義の解明

Regulation of microtubules dynamic instability
by AMPK in cardiomyocytes

大阪大学大学院 生命機能研究科 細胞ネットワーク講座
医化学研究室

平成 26 年度 32A14049 矢白木 翔平

(平成 31 年 3 月 25 日 修了見込)

指導教員 高島成二 教授

Abstract

Recently, AMP-activated protein kinase (AMPK) has been reported to reshape cells by regulating cell polarity and division in addition to its canonical role in metabolism. We previously demonstrated that AMPK controlled cell polarity and migration by modulating microtubule dynamic instability through the phosphorylation of CLIP-170 Ser-311 in migrating cells. However, the relevance of AMPK - CLIP-170 signal on microtubule dynamics remains elusive in cardiomyocytes, which do not migrate and have unique cellular polarity such as an intercalated disc.

First, we tracked the levels of phosphorylation of AMPK and CLIP-170 in the heart during mouse development by Western blotting. The phosphorylation levels of both were significantly elevated in the heart 8 weeks after birth; the pattern was distinct from the constitutive activity found in the liver. Notably, immunohistology revealed that both phosphorylated AMPK and phosphorylated CLIP-170 localized at the intercalated discs in adult mouse heart.

Next, we observed microtubule dynamics by time-lapse imaging in the cardiomyocytes transfected with EGFP - CLIP-170. In cardiomyocytes, CLIP-170 migrated longitudinally from the cell interior toward the cell-cell adhesion site, which was different from the radial movement that was seen in migrating cells. Inhibition of AMPK by Compound C or CLIP-170 S311A mutant showed accumulation of microtubules near the cell-cell junction. Interestingly, a contractile inhibitor, MYK-461, prevented the localization of AMPK at the cell-cell adhesion site; the effect was reversed by wash-out of MYK-461. The treatment of MYK-461 increased individual cell area, and the phenotype was similarly found in S311A transfected cardiomyocytes. Importantly, the cardiomyocytes transfected with CLIP-170 phosphomimic mutant (S311D) showed that the cell size was unaffected by MYK-461, suggesting that mechanical stretching regulated the cell shape by modulating microtubule dynamics through CLIP-170 phosphorylation by AMPK.

Finally, to reveal pathophysiological relevance of AMPK - CLIP-170 signal in the heart, we made inducible heart-specific CLIP-170 S311A overexpressing transgenic mice. S311A mutant mice showed elongation of cardiomyocytes, slowly progressive decrease in cardiac contractile function and tissue fibrosis compared to the control. Furthermore, S311A mutant mice exacerbated the pathological phenotype after administration of a cardiac toxin, doxorubicin: significant decline in cardiac function and severe tissue degeneration.

From these findings, we conclude that AMPK regulates homeostatic cell shape in cardiomyocytes by modulating microtubule dynamic instability through the phosphorylation of CLIP-170 in response to mechanical stress.

要旨

AMPKによる心臓微小管の動的不安定性制御の病態生理学的意義の解明

32A14049 矢白木 翔平

近年、細胞内のエネルギー代謝調節因子として知られるAMPK (AMP-activated protein kinase) は、エネルギー代謝における役割に加えて細胞極性や分裂の制御により細胞形成にも関与していることが明らかとなり、注目を集めている。本研究室では、遊走細胞においてAMPKが微小管のプラス端結合タンパク質であるCLIP-170のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を制御し、細胞極性の形成や細胞遊走に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。しかしながら、CLIP-170はAMPKの新規基質としてマウス心臓ライセートから同定したにもかかわらず、心臓でのAMPK-CLIP-170シグナルの役割は不明であった。

そこで、AMPK-CLIP-170シグナルが微小管の動的制御を介して心臓の適応機能の根幹を担い、心機能の維持に寄与しているという仮説を立て、心筋細胞におけるAMPKによる微小管の動的不安定性制御とその生理的および病態生理学的意義の解明を本研究の目的とした。

まず始めに、マウスの各発達段階における心臓でのAMPKおよびCLIP-170のリン酸化レベルを調べたところ、共に生後8週齢において顕著に増加していることを見出した。さらに、成熟マウス心筋組織においてリン酸化AMPKおよびリン酸化CLIP-170の局在を検討したところ、共に介在板に主に局在することを明らかにした。

次に、心筋細胞での微小管の動的不安定性制御に対するAMPK-CLIP-170シグナルの関与を検討するため、EGFPをN端に付加したCLIP-170を導入した心筋細胞を生細胞タイムラプスイメージングにより観察した。EGFP-CLIP-170 WTを導入した心筋細胞では、CLIP-170は微小管のプラス端の先端に位置する小さな粒状で、細胞の内側から細胞接着に向かって長軸方向に動いた。AMPK阻害剤を加えたところ、微小管の先端に結合するCLIP-170が増加し糸を引いたような形状となり、特に細胞接着部位へ集積することが確認された。また、AMPKによるリン酸化を受けないEGFP-CLIP-170 S311A mutantを導入した心筋細胞においても、同様の現象が見られた。

心筋細胞は、常に拍動によるメカニカルストレスに晒されている。そこで、AMPK-CLIP-170シグナルへのメカニカルストレスの影響を検討するため、拍動を抑制した心筋細胞での解析を行ったところ、AMPKの細胞接着部位への局在が拍動により制御されていることを見出した。さらに、拍動を抑制した心筋細胞では、個々の細胞面積の拡大がみられた。この拍動抑制による細胞面積の拡大は、恒常的リン酸化変異であるCLIP-170 S311D mutantの強制発現により抑制された。また、CLIP-170 S311A mutantを強制発現した心筋細胞では、拍動を抑制せずとも細胞面積の拡大が見られた。これらのことは、メカニカルストレスが、AMPK-CLIP-170シグナルによる微小管の動的制御を介して心筋細胞の細胞面積を制御

し、その恒常性に影響を与えることを示唆するものである。

最後に、AMPK-CLIP-170シグナルの生体内での生理的意義を検討するため、誘導型 CLIP-170 S311A mutant心臓特異的強制発現マウスを作製した。変異タンパク質の誘導から12週経過したCLIP-170 S311Aマウスでは、コントロールと比較して心機能の有意な低下を認めたものの、組織変性は見られなかった。1年以上自然経過したCLIP-170 S311Aマウスでは、コントロールと比較して心機能の有意な低下および線維化を伴った組織変性を認めた。さらに、CLIP-170 S311Aマウスは、ドキソルビシン投与による心不全モデルの病態を悪化させ、微小管の動的制御が病態形成においても重要であることが示された。

これらの結果から、介在板におけるAMPKは、メカノセンシングの機能分子としてCLIP-170のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を制御し、心筋細胞の恒常性維持に関与する可能性が示された。また、変異マウスの解析により、AMPK-CLIP-170シグナルは生理的および病態生理学的にも心機能の維持に重要であることが示唆された。

* 目次

1 緒言（研究の背景）	8
2 研究目的	11
3 実験方法	12
3-1 コンストラクトの作製	12
3-1-1 アデノウイルスベクターの作製	12
3-1-2 トランスジェニックマウス用コンストラクトの作製	12
3-2 新生仔ラット心筋細胞初代培養	12
3-3 siRNA を用いた新生仔ラット心筋細胞での AMPKα ノックダウン	13
3-4 タンパク質定量とサンプル調製	13
3-5 SDS-PAGE	13
3-6 Western blotting 法	13
3-7 免疫染色法	14
3-7-1 細胞免疫染色法	14
3-7-2 組織免疫染色法	15
3-7-3 WGA (Wheat germ agglutinin) を用いた組織免疫染色法	16
3-8 拍動阻害実験	16
3-9 圧負荷実験	17
3-10 生細胞タイムラプスイメージング	17
3-10-1 CLIP-170 のタイムラプスイメージング	17
3-10-2 AMPK の活性バイオセンサーABKAR のタイムラプスイメージング	17
3-10-3 ATP indicator ATeam のタイムラプスイメージング	18
3-11 伸展刺激実験	18

3-12	トランスジェニックマウス作製	19
3-12-1	トランスジェニックマウスの作製	19
3-12-2	トランスジェニックマウスの解析	20
3-13	統計処理	21
4	結果	22
4-1	マウスの心臓における AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルの検討	22
4-2	心臓組織でのリン酸化 AMPK およびリン酸化 CLIP-170 の局在の検討	24
4-3	生細胞タイムラプスイメージングによる心筋細胞での CLIP-170 の動態解析	24
4-4	介在板における AMPK のメカノシグナルへの関与の検証	27
4-4-1	拍動阻害剤処理による心筋細胞での AMPK の局在変化	27
4-4-2	拍動阻害剤処理による心筋細胞の拡大	31
4-5	圧負荷による AMPK 活性への影響の検討	31
4-6	生細胞タイムラプスイメージングによる AMPK 活性動態の解析	32
4-6-1	AMPK/BRSK activity reporter (ABKAR) の検証実験	32
4-6-2	拍動を抑制した心筋細胞での AMPK 活性レベルの測定	32
4-6-3	伸展刺激装置を用いたメカノストレスによる AMPK 活性への影響の検討	36
4-7	AMPK による CLIP-170 のリン酸化の生体内での意義の検討	36
4-7-1	CLIP-170 (S311A / S311D) 心臓特異的強制発現マウスの作製および解析	36
4-7-2	CLIP-170 S311A mutant 病態モデルマウスの作製および解析	37
5	考察	43
6	結言	46
7	参考文献	47
8	業績	53
8-1	原著論文（査読あり）	53

8-2	学会・シンポジウム等における発表.....	53
8-3	その他	54

1 緒言（研究の背景）

AMPK は、AMP によって制御されるセリン/スレオニンキナーゼで、主にエネルギーセンサーとして機能している。AMPK は 1987 年に Hardie らにより acetyl-CoA carboxylase (ACC) をリン酸化してその活性を低下させる酵素として発見された [1]。AMPK はエネルギーが枯渇した状態、すなわち ATP が消費され AMP が増加する状況で活性化される。増加した AMP により活性化された AMPK が基質である ACC を抑制することにより TCA 回路へ回る acetyl-CoA が増加し、より ATP が産生される [2][3]。他にもエネルギー代謝にかかわる酵素が次々に AMPK の基質として同定され [4][5]、それぞれが AMPK によって活性化されることにより ATP の消費を抑制し、産生を促進する方向に向かう。

近年、AMPK やその上流キナーゼである LKB1 は、上記のような代謝における役割に加えて、細胞極性や分裂を制御することにより細胞形成にも関与しているという報告がある [6][7][8][9]。しかしながら、これらの機能に関与する AMPK の下流因子はまだ完全には明らかになっていない。

微小管は、真核生物の主要な細胞骨格の 1 つで、チューブリンのヘテロダイマーが積み重なってできた中空の筒状構造をしている。細胞分裂のメカニズムおよび制御に関わっており、細胞小器官の位置を定め、細胞内輸送を導くレールとしての機能も担っている [10][11][12]。細胞がストレスにさらされた時には、微小管の動きを活発化させて、細胞内での小器官・分泌小胞の動きを促進させ、細胞全体の機能を上げる [13][14][15]。微小管のプラス端は、適切に分泌小胞等を送らせるためのレールとして細胞膜を捕らえるために、細胞膜周辺で非常に速い伸長と退縮を繰り返していると考えられている。このような不安定な動態は動的不安定性 (dynamic instability) と呼ばれ、微小管動態の重要な特徴である [16][17]。微小管の動的不安定性は、伸長、短縮、伸長から短縮への転換 (カタストロフ (catastrophe))、あるいはその逆反応 (短縮から伸長: レスキュー (rescue)) の 4 つのパラメータからなる [18]。微小管の構造や動態は、チューブリンの翻訳後修飾や微小管プラス端結合タンパク質群 (plus-end tracking proteins: +TIPs) の結合によって制御されている [19]。チューブリンの翻訳後修飾には、脱チロシン化、アセチル化、ポリグルタミン酸化、リン酸化、パルミトイル化、ポリグリシン化などがあり、これらは特定の微小管モーターやその他のタンパク質との結合を変化させ、安定性や運動性に影響を及ぼすことが明らかにされている [19][20][21][22]。一方、+TIPs は、微小管との直接結合や +TIPs 同士の相互作用により微小管構造の安定性を調節する [23][24]。+TIPs が未重合のチューブリンあるいは新たに伸長したばかりの伸長端に結合して微小管伸長端に集積し、その後、微小管がさらに伸長するとその +TIPs が微小管から解離する。この現象をトレッドミル運動と呼ぶ [25]。トレッドミル運動をするタンパク質を介

して微小管伸長端に集積する局在化機構をヒッチハイクと呼ぶ。これらのタンパク質は自身で微小管に結合する能力もあることから [26]、ヒッチハイクをするタンパク質群は複数の微小管安定化機構をもつと考えられている。+TIP として最初に発見された CLIP-170 は、プラス端に結合してすぐに離れるというダイナミックな微小管との結合動態をもち、微小管の動的制御や他の細胞骨格と強く関係していると考えられており、多くの報告がなされている [27][28][29]。しかしながら、構造としての機能以外は明確にされていなかった。

所属研究室では、微小管のプラス端結合タンパク質として知られている CLIP-170 の 311 番目のセリンが AMPK によってリン酸化されること、CLIP-170 は微小管の先端に位置し、AMPK によりリン酸化された CLIP-170 は微小管との affinity が弱まることを報告した [30]。さらに、遊走細胞において、AMPK の阻害剤や AMPK の siRNA を加えて CLIP-170 のリン酸化を抑制すると、CLIP-170 の動き、すなわち微小管の伸長スピードが顕著に遅くなり、過度の微小管の安定化がみられると同時に、細胞は前後の極性を失い、細胞遊走が著しく阻害されることを明らかにした [30]。また、AMPK による CLIP-170 のリン酸化部位を同定し、その 311 番目のセリンをアラニンに置換させた S311A mutant 導入細胞においても同様の表現型が観察された。これらの事実より、AMPK-CLIP-170 シグナルは細胞極性にも微小管の伸長制御を介して関与するとの結論を出した。しかしながら、もともとマウス心臓組織ライセートを用いて、AMPK の新規基質として CLIP-170 は同定されたにもかかわらず、心臓での AMPK-CLIP-170 シグナルの生理的意義は不明のままであった。

心臓は常に拍動し、全身に血液を送り出すポンプの役割を果たしている。心臓は、心筋細胞だけでなく心臓線維芽細胞や血管構成細胞など様々な種類の細胞により構成されており、心筋細胞は全体の約 30% 程度で、50% 以上は心臓線維芽細胞が占めている [31]。心筋細胞は、細胞の短辺側のみで介在板を形成し隣り合う細胞と結合するという特有の細胞極性をもっている。介在板の接着構造は、adherence junction、desmosome、gap junction から成り、心筋細胞同士が連動して拍動し、心臓が 1 つの臓器として機能するために非常に重要な場である [32][33]。この介在板部分の電気抵抗は極めて低く、活動電位は極めて容易に伝導する [34][35][36]。この機構を用いて、洞房結節のペースメーカー細胞で発生した活動電位を短時間のうちに心臓を形成するすべての心筋細胞に伝えることが可能となる [37][38]。介在板は心臓の機能にとって非常に重要な構造であるが、心筋細胞におけるこの特有な細胞極性の形成メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。また、介在板は心臓におけるメカノセンシングの中心的な場であり、介在板に存在する TRPV2 チャネルがメカノセンサー分子として機能していることが近年報告されたが [39]、TRPV2 チャネルを介したメカノセンシングの下流の分子機構は全く明らかになっていない。高血圧などの血行動態負荷は心不全の引き金となることか

ら [40][41]、心臓におけるメカノシグナルの理解は重要であり、介在板におけるメカノシグナルの分子機構の解明は、心疾患の発症機序の理解につながり、予防や治療への応用が期待される。

近年、心筋細胞外の環境が心筋細胞の形や長さを規定し、収縮力を制御していることが報告された [42]。心不全では、線維化により細胞外環境が硬くなることで、心筋細胞のリモデリングが起これ心筋細胞は長くなり、細胞の長辺と短辺のアスペクト比が大きくなる [43][44][45]。興味深いことに、心筋細胞は、細胞外環境が適切な硬さであれば 7 : 1 のアスペクト比で、細胞外環境が硬い病的な状態であれば 2 : 1 のアスペクト比で最大の収縮力を発揮する [42]。また、微小管の重合は細胞外マトリックスの硬さに依存し、細胞外が硬い病的な状態においては増加することが報告されている [42]。微小管の重合阻害剤では、細胞外環境の硬さに依存した形態の変化が見られないことより、この心筋細胞の適応現象を支える細胞内骨格タンパク質はアクチン線維ではなく、微小管である。心不全では、過度な微小管の重合がサルコメアとの相互作用を増加させ、収縮の抵抗として振る舞うことにより個々の心筋細胞の収縮力の低下を引き起こす [46][47]。すなわち、細胞内骨格としての微小管は細胞の硬さを規定し、心筋細胞の収縮力を制御する内在性の因子として重要な役割を担っている。

微小管の増加および安定化は病態形成においても重要である。心臓圧負荷による心不全モデルマウスの心臓では微小管の顕著な増加がみられ、微小管の重合阻害剤 Colchicine を腹腔内投与によりその微小管の増加は解消され、心不全病態も改善することが報告されている [48]。一方、脱重合阻害により微小管を安定化させる作用を持つ Paclitaxel は、抗がん剤として広く使用されているが、副作用として心機能の低下を引き起こすことが報告されている [49]。さらに拡張型心筋症、肥大型心筋症といったヒト心不全サンプルにおいて安定化微小管量が増加しており、病態形成に関与している可能性があることが示された [50]。

上述したように、細胞内骨格である心臓微小管のスナップショットというべき静的な状態が、心筋細胞の形態・収縮性といった恒常性維持、ひいては病態形成において重要であることは疑う余地はない。しかしながら、その重合・脱重合を含めた動的な平衡を制御する内因性の機構についてはこれまで全く未解明であった。

2 研究目的

本研究では、常に拍動しエネルギー消費の激しい心筋細胞において、微小管の動的制御を介して AMPK-CLIP-170 シグナルが心臓の適応機能の根幹を担い、心機能の維持に寄与しているという仮説を立て、心臓における AMPK による微小管の動的不安定性制御とその意義の解明および AMPK-CLIP-170 シグナルのメカノシグナルへの関与の検証を目的とした。

3 実験方法

3-1 コンストラクトの作製

3-1-1 アデノウイルスベクターの作製

目的の遺伝子(EGFP-CLIP-170 WT/S311A/S311D、PM/Cyto-ABKAR、PM/Cyto-ATeam)を pBluescript II KS(-) に入れ、その後 pENTR1A Dual Selection Vector にサブクローニングし、さらに LR Recombination 反応により pAd-CMV-V5-DEST に移し、コンストラクトを作製した。次に、ヒト胎児腎細胞をアデノウイルスの E1 遺伝子によりトランスフォーメーションして樹立された細胞株 HEK 293A 細胞に作製したコンストラクトをトランスフェクションして、Adeno virus を増幅し、Vivapure® AdenoPACK™ 20 を用いて精製した。

3-1-2 トランスジェニックマウス用コンストラクトの作製

受精卵に injection するコンストラクトの作製には、大阪大学大学院医学系研究科の宮崎純一教授からいただいた pCAG-CATZ ベクターを用いた。pCAG-CATZ から lacZ と poly A を取り除き、SV40-poly A を挿入し、さらに loxP と SV40 の間に CLIP-170 (S311A/S311D)を挿入した。作製したベクターを増幅し、pCAG-CATZ～SV40-poly A 部分のみを切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit を用いて精製した。

3-2 新生仔ラット心筋細胞初代培養

新生仔ラットから心臓を摘出し、Hanks medium 内で引き裂いてほぐし、血液を洗い出す。ほぐした心臓を 0.25% Trypsin/EDTA に入れ、4℃で Overnight 静置する。翌日、D-MEM を加え、37℃で 5 分インキュベートする。上清を捨て、コラゲナーゼを加える。軽く揺らし、上清を捨て、スターラーバーを入れた 50 ml フラスコに心臓を移す。コラゲナーゼを加え、15 分間 37℃に温めたスターラーで攪拌する。上清を新しい 50 ml コニカルに回収し、新たにコラゲナーゼを加える。この操作をさらに 2 回繰り返す (計 3 回)。回収した上清を遠心し (1000rpm, 5 分間)、上清を捨てる。D-MEM で細胞ペレットを優しくほぐし、P10 dish に播種し、37℃で 70 分間インキュベートする。この過程で線維芽細胞は dish に付着し、培養上清に心筋細胞が分離される。上清で dish を wash し、新しい 50 ml コニカルに上清を回収する。回収した上清を遠心し (1000rpm, 5 分間)、上清を捨てる。必要に応じた量の medium で懸濁し、細胞数をカウントする。実験に応じて、適当な細胞濃度で播種する。

3-3 siRNA を用いた新生仔ラット心筋細胞での AMPK α ノックダウン

AMPK α 1 および α 2 に対する siRNA には、Silencer® Select siRNA (AMPK α 1 siRNA ID : s134808, AMPK α 2 siRNA ID:s134962) <Thermo>を用いた。最終濃度が siRNA for AMPK α 1 30 nM および siRNA for AMPK α 2 10 nM となるように調製し、Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen)を用いて播種してから 3 時間後の新生仔ラット心筋細胞に導入した。その後、37℃で 72 時間インキュベートし、細胞を回収した。

3-4 タンパク質定量とサンプル調製

タンパク質濃度の検量線を作成するために、0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml に調整した BSA を 96 well plate に 2 well ずつ添加した (10 μ l/well)。次に、サンプルを 10 倍希釈し、2well ずつに 10 μ l/well で添加した。BCA 試薬 (BCA protein assay reagent A : BCA protein assay reagent B = 50 : 1) を調整して 90 μ l/well で添加し、室温で 30 分間振とうしてから 570 nm の波長における吸光度を測定した。

タンパク質濃度を測定したサンプル 10 μ g/ μ l 分をエッペンチューブに取り、1 \times Sample Buffer、DTT、ブロモフェノールブルーを加えて調整し、70℃で 10 分インキュベートしたものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

3-5 SDS-PAGE

目的タンパク質サイズに合わせた固さのポリアクリルアミドゲルを作成する。泳動槽にゲル板をセットし、1 \times Running Buffer を加える。ゲル板の well にマーカーとサンプルをアプライし、Power Pac HC™ を定電圧 200V にして約 40 分間電気泳動する。

3-6 Western blotting 法

メンブレンをメタノールに浸し、プレウォッシュしておく。

(Wet Transfer)

カセットの白い部分を下にして、Fiber Pad→ろ紙→メンブレン→ゲル→ろ紙→Fiber Pad の順に空気が入らないように重ねる。カセットを転写槽にセットし、Towbin's Buffer を転写槽に満たす。Power Pac HC™ を定電圧にして、100 mV で 60 分転写する。

(セミドライ Transfer)

トランスファー装置にセミドライ用 Buffer に浸したろ紙を敷き、その上にメンブレン、ゲルの順に乗せる。セミドライ用 Buffer に浸したろ紙をさらに上から乗せ、Power

Pac HC™ を定電圧にして、15 mV で 40 分間転写した。転写後は、1×TTBS で 5 分 Wash を行い、3%BSA を入れ 30 分間ブロッキングを行う。ブロッキング後、1×TTBS で 5 分 Wash を行い、一次抗体を入れ 4℃で Over night する。

抗体名	Host	希釈倍率	会社	備考
phosphorylated AMPK α	rabbit	1/500	Cell Signaling	polyclonal
AMPK α	rabbit	1/500	Cell Signaling	polyclonal
CLIP-170	mouse	1/500	HPA	polyclonal
α -Tubulin	rabbit	1/1000	Cell Signaling	Polyclonal
phosphorylated CLIP	rabbit	1/500	自作	Polyclonal
phosphorylated ACC	rabbit	1/1000	Cell Signaling	Polyclonal

Over night 後、1×TTBS で 5 分間 Wash を 3 回行い、二次抗体を入れて室温で 1 時間振とうする。その後、1×TTBS で 5 分間 Wash を 3 回行い、検出液である ECL (A 液 : B 液=1:1) をメンブレンに全体になじませる。シート上にメンブレンを置き、LAS-4000 で撮影し、画像を取り込む。

3-7 免疫染色法

3-7-1 細胞免疫染色法

細胞を 37℃に温めた PBS 1ml で 1 度 wash し、-20℃で保存している MeOH(100%)を 1ml 加え、-20℃で 10 分間固定する。固定後、MeOH を回収し(廃液タンクに捨てるため)、PBS 1ml で 1 度 wash する。0.1% Triton-X を 1ml 加え、室温で 5 分間置く。0.1% Triton-X を取り除き、PBS 1ml で 5 分間 wash を 1 回行う。Blocking 溶液 (5% goat serum + 1% BSA (globulin free) in PBS)を作製し、30 分間 Blocking 処理を行う。Primary antibody を Blocking 溶液で希釈し、100 μ l ずつ加える。湿潤 Box に入れて、4℃で Over night。

抗体名	Host	希釈倍率	会社名	備考
phosphorylated AMPK α	rabbit	1/100	Cell signaling	polyclonal
Connexin43	rabbit	1/200	abcam	polyclonal
Plakoglobin	guinea pig	1/400	PROGEN	polyclonal
AMPK β 2	rabbit	1/100	HPA	polyclonal
N-cadherin	mouse	1/200	Santa Cruz	Monoclonal
α -actinin	mouse	1/200	abcam	Monoclonal
LKB1	rabbit	1/200	Cell signaling	Polyclonal
α -Tubulin	mouse	1/200	abcam	Monoclonal

Over night 後、PBS 1ml で 3 度 wash し、Secondary antibody (mouse, rabbit, guinea pig; Alexa 488/568/647)を Blocking 液で 400 倍希釈し、100 μ l ずつ加える。この時、Hoechst も一緒に 1000 倍希釈する。室温で 30 分間置く。その後、PBS 1ml で 5 分間 wash を 3 回行う。観察は蛍光顕微鏡 (LSM710, Zeiss)、および共焦点レーザー走査顕微鏡 (FV1000-D (IX) 倒立型)で行った。

3-7-2 組織免疫染色法

-80°Cに保存しているスライドガラスサンプルを溶かして乾かし、冷やしておいたアセトンに浸し、4°Cで 20 分間固定する。固定後、ドライアップし、Liquid block マーカーでサンプルの周りを縁取る。マーカーが乾いたら、PBS で 5 分間 wash を 1 回行う。水気をよく切り、0.1% Triton を加え、室温で 5 分置く。0.1% Triton をよく落として、PBS で 5 分間 wash を 1 回行う。水気をよく切り、Blocking 溶液(5% goat serum + 1% BSA(globulin free) in PBS)を加え、室温で 30 分置く。Blocking 溶液をよく落として、PBS で 5 分間 wash を 3 回行う。Mouse heart サンプルで anti-mouse 抗体を使用するときには、水気をよく切り、Fab fragment (0.1mg/ml in PBS<130 倍希釈>) を加え、室温で 1 時間置く。その後、Primary antibody を Blocking 溶液で希釈し加える。湿潤 Box に入れて、4°Cで Over night。

抗体名	Host	希釈倍率	会社名	備考
phosphorylated AMPK α	rabbit	1/100	Cell signaling	polyclonal
Connexin43	rabbit	1/200	abcam	polyclonal
Plakoglobin	guinea pig	1/400	PROGEN	polyclonal
AMPK β 2	rabbit	1/100	HPA	polyclonal
N-cadherin	mouse	1/200	Santa Cruz	Monoclonal
α -actinin	mouse	1/200	abcam	Monoclonal
LKB1	rabbit	1/200	Cell signaling	Polyclonal
a-Tubulin	mouse	1/200	abcam	Monoclonal

Over night 後、抗体液をよく落として、PBS で 5 分間 wash を 3 回行う。水気をよく切り、Secondary antibody を Blocking 溶液で 400 倍希釈し加える。この時、Hoechst も一緒に 1000 倍希釈する。(rabbit, guinea; pigAlexa 488/647) 室温で 45 分間置く。抗体液をよく落として、PBS で 5 分間 wash を 3 回し、ドライアップさせる。その後、封入体をのせ、カバーガラスをかぶせ、乾燥させる。観察は、蛍光顕微鏡 (LSM710, Zeiss)、および共焦点レーザー走査顕微鏡 (FV1000-D (IX) 倒立型)で行った。

3-7-3 WGA (Wheat germ agglutinin) を用いた組織免疫染色法

-80℃に保存しているスライドガラスサンプルを溶かして乾かし、冷やしておいたアセトンに浸し、4℃で20分間固定する。固定後、ドライアップし、Liquid block マーカーでサンプルの周りを縁取る。マーカーが乾いたら、PBS で5分間 wash を1回行う。水気をよく切り、Alexa Fluor 647 conjugate of WGA (Invitrogen)を PBS で100倍希釈し添加し、室温で30分間放置する。抗体液をよく落とし、PBS で5分間 wash を2回行う。その後、水気をよく切り、Blocking 溶液(5% goat serum + 1% BSA(globulin free) in PBS)を加え、室温で30分置く。Primary antibody (anti-Plakoglobin <guinea pig>)を Blocking 溶液で希釈し加え、湿潤 Box に入れて、4℃で Over night。

Over night 後、抗体液をよく落として、PBS で5分間 wash を3回行う。水気をよく切り、Secondary antibody(guinea pig: Alexa 488)を Blocking 溶液で400倍希釈し加える。この時、Hoechst も一緒に1000倍希釈する。室温で45分間置く。抗体液をよく落として、PBS で5分間 wash を3回し、ドライアップさせる。その後、封入体をのせ、カバーガラスをかぶせ、乾燥させる。観察は、蛍光顕微鏡 (LSM710, Zeiss)で行った。

3-8 拍動阻害実験

心筋細胞の拍動を抑制するため、ミオシン ATPase 阻害剤である MYK-461 を用いた。ガラスボトム dish に播種してから72時間経過し、dish への生着および細胞間接着が成熟した心筋細胞に、MYK-461 を終濃度 2 μ M となるように加えた。MYK-461 処理2時間後に細胞を固定し、免疫染色法により細胞接着部位の AMPK への影響を検討した。さらに、MYK-461 処理2時間後にメディウムの wash out により MYK-461 を除き、心筋細胞の拍動を再開させ、拍動阻害による影響が拍動の再開によりレスキューされるか検討した。

また、拍動を抑制した心筋細胞において、細胞の大きさへの影響および AMPK-CLIP-170 シグナルとの関連性の検討を行った。ガラスボトム dish に播種してから48時間経過した心筋細胞に EGFP-CLIP-170 WT/ S311A/ S311D を発現させる Adeno virus をそれぞれ添加し、37℃で24時間インキュベートした後にメディウム交換を行い、MYK-461 を添加した (終濃度 2 μ M)。MYK-461 処理2時間後に固定し、免疫染色法により α -actinin および CLIP-170 を染色し、蛍光顕微鏡 (LSM710, Zeiss)により観察および画像の取得を行った。IN Cell Analyzer 6000 を用いて取得した画像から α -actinin シグナルを解析し、1つ1つの細胞を ROI で囲み、細胞面積を測定し比較した。

3-9 圧負荷実験

大阪大学大学院工学研究科 機械工学専攻 知能機械部門の金子真教授・伊藤弘明先生にご協力いただき、3 気圧の圧負荷を周期的に加えることができる装置をお借りした。ガラスボトム dish に播種してから 72 時間経過し、dish への生着および細胞間接着が成熟した心筋細胞に、拍動阻害剤 MYK-461 を添加し (終濃度 2 μ M)、その直後に圧負荷を加えた。圧負荷の条件については、平滑筋細胞において圧負荷によりストレスファイバーの重合およびフィブロネクチン原線維形成が増加するという金子教授らによる論文で用いられた条件を参考に条件検討を行った [51]。その結果、3 気圧の圧負荷を 1 分間加えた後、大気圧 (1 気圧) に 1 分間戻し、再び 3 気圧の圧負荷を 1 分間加えるという周期的な刺激を 8 時間行う条件を採用した。圧負荷刺激後に細胞を固定し、免疫染色法により細胞接着部位の AMPK への影響を検討した。圧負荷中は 37°C になるよう温度管理を行った。また、圧負荷中は二酸化炭素濃度管理ができないため、メディウムに HEPES (2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, Sigma) 緩衝液を終濃度 10 mM となるように加えた。コントロールには、MYK-461 を添加した後も 37°C 大気圧下でインキュベートした心筋細胞を用いた。

3-10 生細胞タイムラプスイメージング

3-10-1 CLIP-170 のタイムラプスイメージング

コラーゲンコーティングした 35mm ガラスボトム dish に播種後 48 時間経過した新生仔ラット心筋細胞に、作製した EGFP-CLIP-170 WT/S311A/S311D Adeno virus を 1000 倍希釈したものから 10 μ l を添加し、37°C で 24 時間インキュベートする。フェノールレッド free 培地に培地交換し、インキュベーター電動ステージ付き Olympus IX-83 倒立型リサーチ顕微鏡 (温度 37°C, 二酸化炭素 5% 濃度条件下) でタイムラプスイメージング撮影を行った。対物レンズは 60 倍の油浸レンズを用いた。U-MNIBA2 フィルターユニット (470-495 励起波長フィルター / 510-550 蛍光波長フィルター) を用いて、露光時間 200 ミリ秒で 30 秒毎に撮影を 30 分から 2 時間行った。AMPK 阻害剤 Compound C は終濃度 20 μ M となるように加えた。コントロールには DMSO を Compound C と同量加えた。AMPK α 1 α 2 ノックダウン心筋細胞でのイメージングは、siRNA 導入から 48 時間後に Adeno virus により EGFP-CLIP-170 を導入し、siRNA 導入から 72 時間、Adeno virus 添加から 24 時間後に撮影を行った。

3-10-2 AMPK の活性バイオセンサー ABKAR のタイムラプスイメージング

播種後 24 時間経過した新生仔ラット心筋細胞および HeLa 細胞に、作製した PM/Cyto-

ABKAR Adeno virusを100倍希釈したものから5 μ lを添加し、37°Cで48時間インキュベートする。フェノールレッドfree培地に培地交換し、インキュベーター電動ステージ付きOlympus IX-83倒立型リサーチ顕微鏡（温度37°C、二酸化炭素5%濃度条件下）でタイムラプスイメージング撮影を行った。ガラスボトムdishでの観察の際は、対物レンズは60倍の油浸レンズを、シリコンチャンバーでの観察の際は40倍の水浸レンズを用いた。蛍光出力50 %、露光時間500 msで撮影を行った。解糖系の阻害剤である2-Deoxy-D-glucose (2DG)は終濃度10 mM、電子伝達系の阻害剤であるOligomycin Aは終濃度0.01 μ g/mlとなるように加えた。

3-10-3 ATP indicator ATeam のタイムラプスイメージング

播種後24時間経過した新生仔ラット心筋細胞およびHeLa細胞に、作製したPM/Cyto-ATeam Adeno virusを100倍希釈したものから5 μ lを添加し、37°Cで48時間インキュベートする。フェノールレッドfree培地に培地交換し、インキュベーター電動ステージ付きOlympus IX-83倒立型リサーチ顕微鏡（温度37°C、二酸化炭素5%濃度条件下）でタイムラプスイメージング撮影を行った。対物レンズは60倍の油浸レンズを用いた。蛍光出力30 %、露光時間500 msで撮影を行った。解糖系の阻害剤である2-Deoxy-D-glucose (2DG)は終濃度10 mM、電子伝達系の阻害剤であるOligomycin Aは終濃度0.01 μ g/mlとなるように加えた。

3-11 伸展刺激実験

シリコンチャンバー (STREX)上に播種した心筋細胞に伸展刺激装置 (STREX)を用いて、外部から人工的にメカニカルストレスを与える実験系を構築した。シリコンチャンバーのコートニングにはラミニン (Sigma)を用いた。プラズマ処理装置(STREX)によりシリコンチャンバーにプラズマ処理を施し、その直後に10 μ g/mlとなるように滅菌水で調製したラミニンを加えて37°Cで1時間インキュベートし、シリコンチャンバーにラミニンをコートニングする。ラミニン溶液を除きPBSで1度washした後、心筋細胞を播種する。播種から72時間後に、伸展刺激装置ごと顕微鏡にセットし、温度37°C・二酸化炭素5%濃度条件下で伸展刺激を加えた。伸展刺激は2段階に設定し、まず10%伸展させ、そこからさらに20%まで伸展させ、20%伸展状態を1時間保った後に伸展を解除した。顕微鏡による撮影は、伸展刺激前、10%伸展直後、20%伸展直後、20%伸展1時間後、伸展解除から5分後に行った。

3-12 トランスジェニックマウス作製

動物実験については、施設内の動物実験講習会を受講し、大阪大学動物実験委員会において研究課題の承認を受けている。また、実験は全て動物愛護法等に則って行った。

3-12-1 トランスジェニックマウスの作製

動物実験施設生殖工学ユニットへ依頼し、作製したコンストラクトをマウス受精卵へ injection し、その受精卵をマウスへ移植 (WT・S311A・S311Dを10匹ずつ)していただいた。CAG-CATZ - CLIP-170 WT遺伝子を injection した受精卵を移植したマウスからは17匹、CAG-CATZ - CLIP-170 S311A遺伝子を injection した受精卵を移植したマウスからは33匹、CAG-CATZ - CLIP-170 S311D遺伝子を injection した受精卵を移植したマウスからは12匹の新生仔が生まれた。ジェノタイピングによりCAG-CATZ - CLIP-170遺伝子が発現しているかを確認するため、生まれたマウスが3週齢ほどになるまで待ち、マウスの耳の皮膚からDNAを抽出した。ジェノタイピングはCATおよびCre配列に対するプライマーを用いて行った。その結果、CAG-CATZ - CLIP-170 WT遺伝子を発現しているマウスは2匹、CAG-CATZ - CLIP-170 S311A遺伝子を発現しているマウスは3匹、CAG-CATZ - CLIP-170 S311D遺伝子を発現しているマウスは2匹確認できた。この7匹を8週齢になるまで1ケージ1匹飼いにし、germline transmissionを確認するため、WTのC57BL6Jマウスとかけ合わせた。生まれた新生仔のうち、CAG-CATZ - CLIP-170 WT/S311A/S311D遺伝子を発現しているマウスと α MHCプロモーター配列を上流に持つMer-Cre-Mer (+/-)マウスとをかけ合わせ、CLIP-170 (WT / S311A/ S311D) 強制発現トランスジェニックマウス (CLIP-170 flox/+; Mer-Cre-Mer+/-)を作製した。

8週齢から12週齢のCLIP-170 S311A/ S311Dマウスにおいて、腹腔内注射によりタモキシフェン (Sigma)を6日間連続で投与し (20 mg/kg/day)、変異タンパクの発現を誘導した。タモキシフェンはPeanut oil (Sigma)を用いて調製した。タモキシフェンの投与により、細胞質に発現しているmer-Cre-merが核へ移行し、loxPで挟まれた配列を取り除く。その結果、CLIP-170の発現が誘導される。

また、CLIP-170 S311Aマウスの心不全病態モデルを作製するため、抗がん剤として広く使われ副作用として心毒性をもつドキソルビシンを用いた。8週齢のCLIP-170 S311Aマウスにタモキシフェン投与により変異タンパク質の発現を誘導し、タモキシフェン投与開始2週間後からドキソルビシンを腹腔内注射により4週間 (週に3回, 4 mg/kg/day)投与した。

3-12-2 トランスジェニックマウスの解析

心機能の評価には、心エコーにより測定した左室内径短縮率 (fractional shortening) を用いた。コントロールのマウスには、Mer-Cre-MerのみもしくはCAG-CATZ - CLIP-170遺伝子のみを発現している、同腹のマウスを用いた。

また、CLIP-170 S311Aマウスの心臓を組織学的に評価するため、心エコーによる経時観察後に心臓を摘出し、凍結包埋を行った。摘出した心臓を心基部側と心尖部側で2等分になるように輪切りにし、O.C.T Compoundによりそれぞれを包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタンの中で凍結させる。その後、クライオスタックにより凍結包埋した心臓サンプルを厚さ8 μm で薄切し、プレパラートに貼り付け、心臓組織切片サンプルを作製した。膠原線維と筋線維を染め分けることができるマッソン・トリクローム染色を用いて、CLIP-170 S311Aマウスにおける線維化を評価した。マッソン・トリクローム染色は、株式会社アプライドメディカルリサーチに依頼した。染色像の観察は、Olympus CKX41 倒立型ルーチン顕微鏡により行い、線維化の度合いによりスケーリングを行った (スケーリングクラス : 0, +1, +2, +3, 0: perivascular fibrosisのみでInterstitial fibrosisがない, +1 : Interstitial fibrosisが少しある, +2 : Interstitial fibrosisが局所的に+1以上ある, +3 : Interstitial fibrosisが広範囲に多くある、もしくは+2相当が複数箇所みられる)。

さらに、より詳細な構造の変化を評価するため、電子顕微鏡による観察を行った。電子顕微鏡用サンプルとして、タモキシフェン投与後1年以上経過したCLIP-170 S311Aマウスの心臓を摘出し、グルタルアルデヒドによる固定を行い、樹脂包埋を行った。その後、準超薄切を用いて観察部位を選定し、超薄切を作製し透過型電子顕微鏡 (H-7650)により観察した。電子顕微鏡用サンプルの樹脂包埋および準超薄切・超薄切作業については、大阪大学大学院医学系研究科共同研に依頼した。

また、コントロールマウスおよびCLIP-170 S311Aマウスの心臓において、心筋細胞の大きさを比較検討するために、WGA (Wheat germ agglutinin)を用いた組織染色を行った。蛍光顕微鏡 (LSM710, Zeiss)により観察および染色像の取得を行い、ZEISSのイメージングソフトウェアZENを用いて長軸方向で切れて断面に長方形状で出ている細胞1つ1つの長さを測定し比較した。

さらに、心エコーでは評価できない心右室の機能を評価するため、MRIによる観察も行った。MRIは、国立循環器病センターの7テスラ小動物用MRIを使用した。マウスは、イソフルランの吸入麻酔により眠らせた状態で観察を行った。装置の運用および画像の取得には、大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻 医療技術科学分野 医用物理工学講座の斎藤茂芳先生にご協力いただいた。

3-13 統計処理

エクセル統計に従って、分散分析の結果、Student t-test法、Cochran-Armitage-Test法による2群間比較検定、およびTukey-Kramer法による多重比較検定を行った。危険率は5%で有意差を検定した。

4 結果

4-1 マウスの心臓における AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルの検討

本研究室の研究により、遊走細胞において AMPK は CLIP-170 のリン酸化を介して微小管の伸長速度を制御し、細胞の極性や細胞の遊走の制御に関与していることを明らかにしている。そこで、AMPK-CLIP-170 シグナルの心臓での意義を検討するため、胎児期から生後 8 週齢期までの各発達段階のマウスの心臓において AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルに変化があるかどうかを、各発達段階のマウスの心臓をホモジネートしたサンプルを用いて Western blotting 法により解析した。その結果、代謝系における AMPK のメインの基質である acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化量、total の AMPK の量および total の CLIP-170 の量に各発達段階で変化が見られないのに対して、AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルが共に胎児期や生後数日齢と比較して 8 週齢期のマウスの心臓において顕著に増加していることが認められた (Figure.1a)。一方で、肝臓ではマウスの発達に伴って AMPK および ACC のリン酸化レベルが共に増加していた。また、CLIP-170 のリン酸化レベルには各発達段階で変化が見られなかった (Figure.1b)。

これらの結果から、AMPK-CLIP-170 シグナルが 8 週齢期頃に心臓で何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。この 8 週齢期頃というのは、心臓において介在板が成熟する時期と重なっている。胎児期には介在板は存在せず、細胞は全周性に細胞接着を形成している。生後徐々に介在板が形成され、7 週から 8 週齢期に成熟する [52]。したがって、AMPK と CLIP-170 は介在板に関連した何らかの役割を持っているのではないかと考えられた。

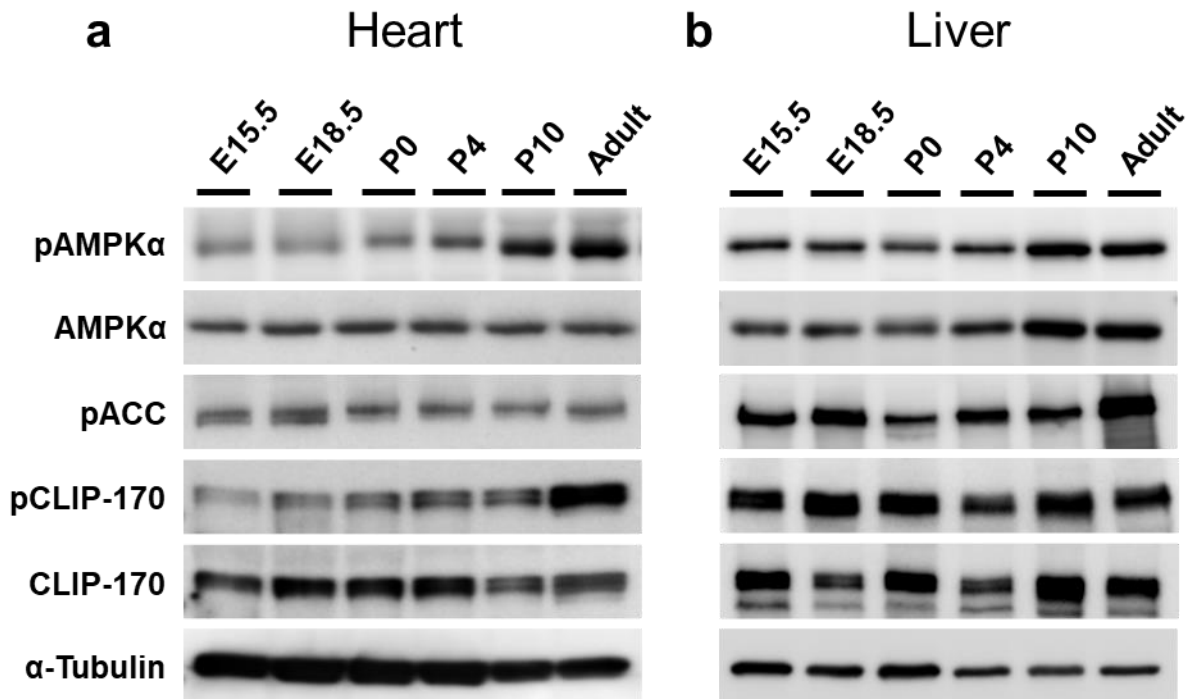


Figure.1 マウスの心臓における AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルの検討

マウスの胎児期 15 日目 (E15)から生後 8 週齢 (Adult)までの各発達段階の (a)心臓および (b)肝臓をホモジネートしたサンプルを用いて、各発達段階での AMPK および CLIP-170 のリン酸化レベルを Western blotting 法により解析した (pAMPK:リン酸化 AMPK, pCLIP-170:リン酸化 CLIP-170, pACC: リン酸化 ACC)。

4-2 心臓組織でのリン酸化 AMPK およびリン酸化 CLIP-170 の局在の検討

そこで、8 週齢の成熟マウスの心臓を用いて凍結切片を作製し、心筋組織内におけるリン酸化 AMPK およびリン酸化 CLIP-170 の局在を組織免疫染色法により検証した。その結果、リン酸化 AMPK、リン酸化 CLIP-170 共に心筋組織では介在板に局在していることが確認された (Figure.2a, b)。また、total の AMPK、total の CLIP-170 および AMPK の上流キナーゼの 1 つである LKB1 も介在板に局在することを認めた (Figure.2c, d, e)。これらの結果から、心筋組織では AMPK は介在板において CLIP-170 をリン酸化することにより、何らかの機能を果たしているのではないかと考えられた。

4-3 生細胞タイムラプスイメージングによる心筋細胞での CLIP-170 の動態解析

心筋細胞での微小管の動的不安定性制御に対する AMPK-CLIP-170 シグナルの関与を検討するため、EGFP 付き CLIP-170 を用いて CLIP-170 の細胞内動態を生細胞タイムラプスイメージングにより観察した。細胞は新生仔ラット心筋細胞を用いた。新生仔ラット心筋細胞は、成獣心筋組織ほどのはっきりとした極性は持たないが、介在板の構成分子であるギャップジャンクションタンパク質・デスモゾームタンパク質・アドヘレンスジャンクションタンパク質から成る細胞接着を隣り合う心筋細胞と形成する。EGFP-CLIP-170 WT および EGFP-CLIP-170 S311A mutant を導入した新生仔ラット心筋細胞において、表現型を比較した。EGFP-CLIP-170 WT を導入した心筋細胞では、EGFP-CLIP-170 WT は微小管のプラス端の先端に位置する小さな粒状で、細胞の内側から細胞接着に向かって長軸方向に動いた。これは、遊走細胞における CLIP-170 が微小管形成中心 (microtubule organizing center <MTOC>) から端の方に放射状に動くという結果と大きく異なる。EGFP-CLIP-170 WT を導入した心筋細胞に AMPK 阻害剤である Compound C を加えたところ、微小管の先端に結合する EGFP-CLIP-170 WT が増加し糸を引いたような形状となり、特に細胞接着部位へ集積することが確認された (Figure.3a, c)。また、Compound C 処理による非特異的キナーゼ阻害の影響を取り除くため、AMPK α 1 および α 2 を siRNA によりノックダウンした心筋細胞において EGFP-CLIP-170 WT の動態を観察したところ、微小管の先端に結合する EGFP-CLIP-170 WT が増加し、細胞接着部位への蓄積を認めた (Figure.3b, c)。さらに、311 番目のセリンをアラニンに置換した AMPK によるリン酸化を受けない EGFP-CLIP-170 S311A mutant を導入した心筋細胞において、EGFP-CLIP-170 S311A mutant は Compound C 処理や AMPK α 1 α 2 ノックダウンと同様の挙動を示した (Figure.3a, c)。これらの結果から、心筋細胞においても微小管プラス端への CLIP-170 の集積は AMPK による CLIP-170 の 311 番目のセリンのリン酸化によって制御されていることが示唆された。

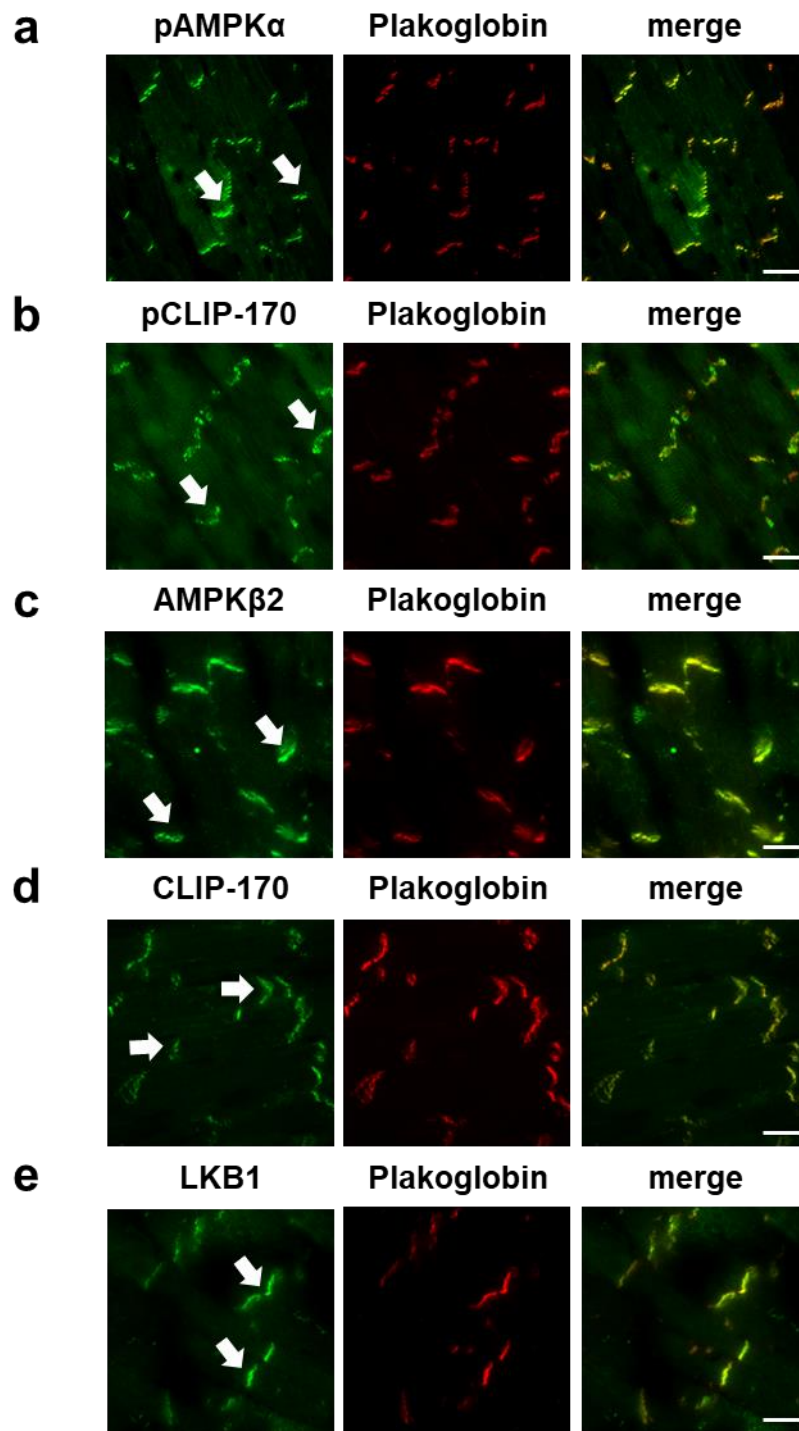


Figure.2 マウス心臓組織での AMPK および CLIP-170 の局在の検討

8 週齢の成熟マウスの心臓を用いて凍結切片を作製し、心筋組織内におけるリン酸化 AMPK、リン酸化 CLIP-170、および total の AMPK (AMPKβ2)、total の CLIP-170、LKB1 の局在を組織免疫染色法により検証した。Scale bar: 20 μm (a-e)。

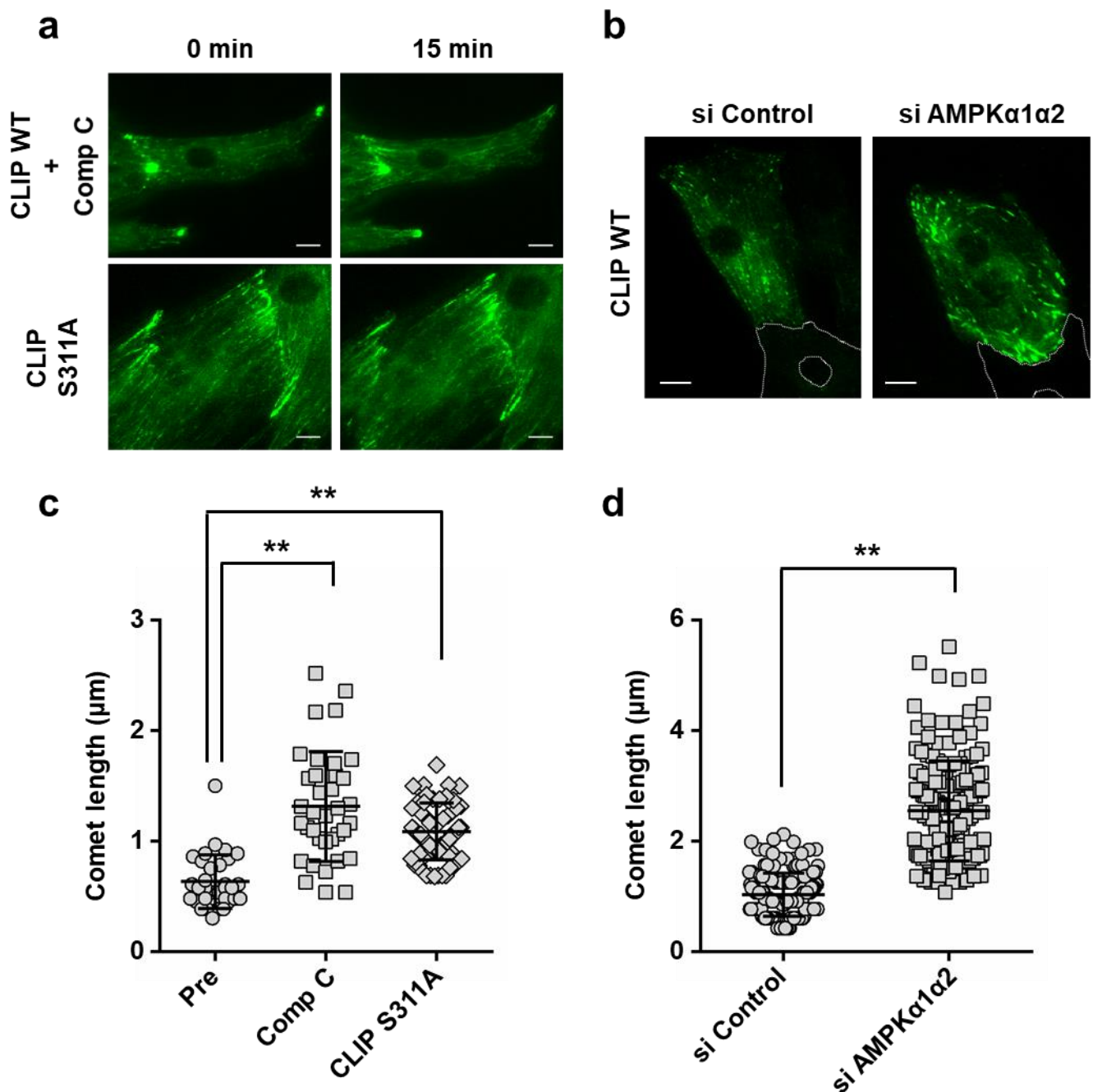


Figure.3 拍動を抑制した心筋細胞における AMPK への影響の検討

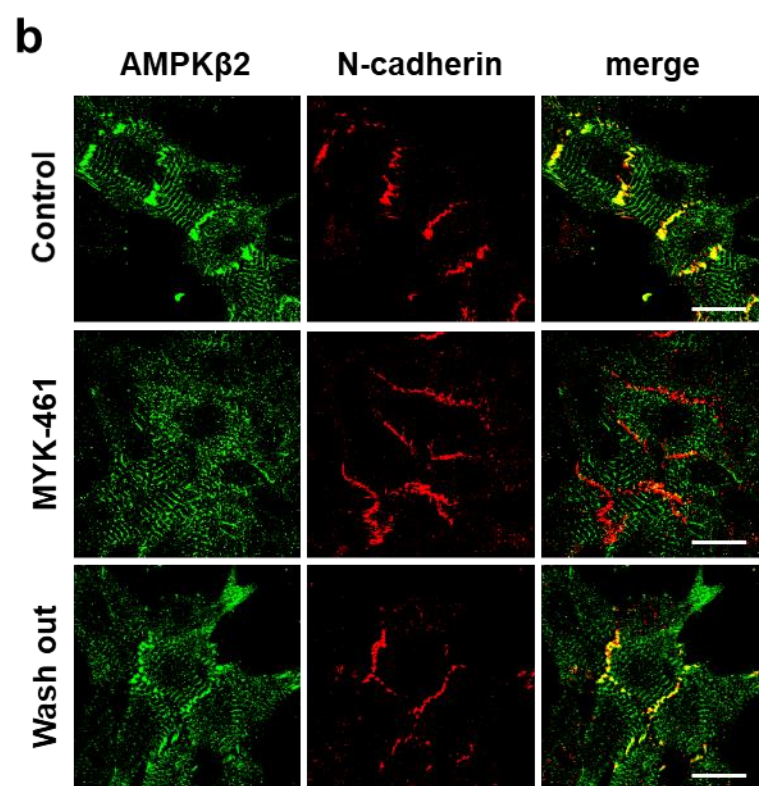
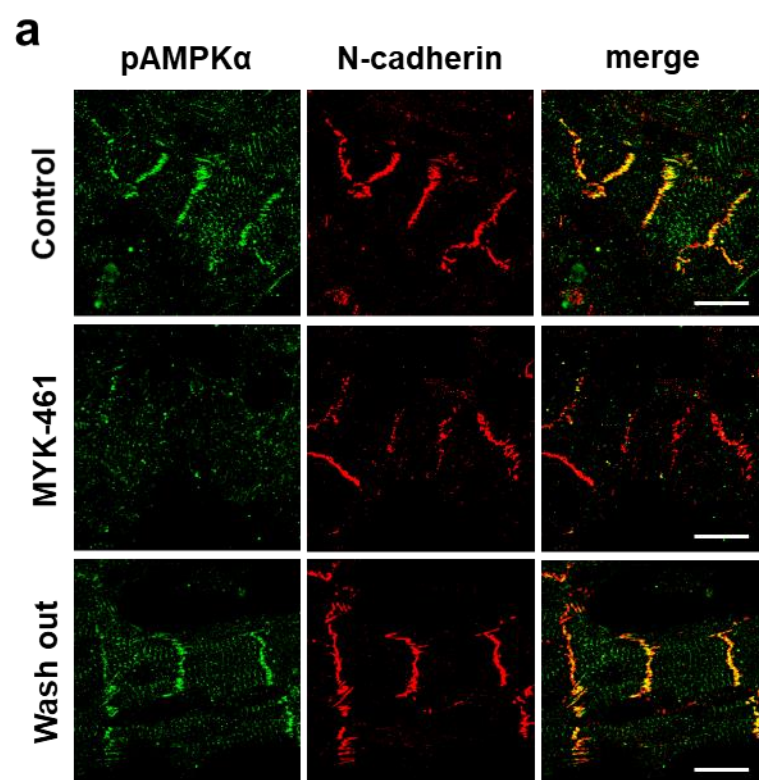
(a) EGFP-CLIP-170 WT/S311A を導入した心筋細胞を 30 秒毎に撮影した。EGFP-CLIP-170 WT を発現させた心筋細胞には、撮影の途中で AMPK 阻害剤 Compound C (終濃度 20 μM) を添加した。(b) AMPKα1 および α2 を siRNA によりノックダウンした心筋細胞において、EGFP-CLIP-170 WT の動態を観察した (白点線：隣接する細胞)。(c)(d) 撮影した画像から微小管の先端に位置する EGFP-CLIP-170 の長さ (Comet length) を解析した。Scale bar: 5 μm (a, b). (c) : Data means ±S.D. **, P<0.01 vs Pre by Tukey's multiple comparisons test, one-way ANOVA. (d) : Data means ±S.D. **, P<0.01 vs si Control by Student t-test.

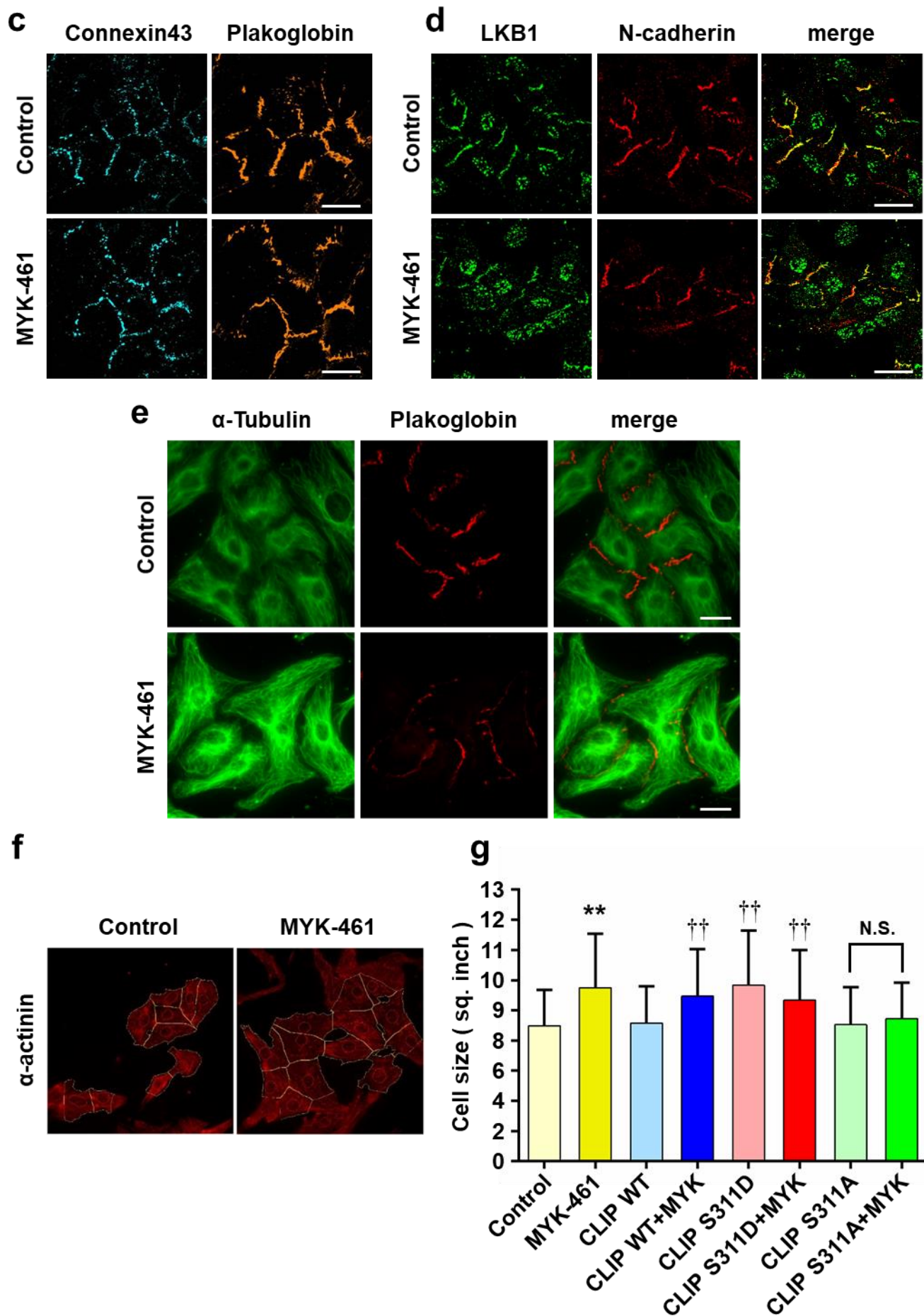
4-4 介在板における AMPK のメカノシグナルへの関与の検証

4-4-1 拍動阻害剤処理による心筋細胞での AMPK の局在変化

AMPK—CLIP-170 シグナルによる微小管の動的制御における AMPK の上流については未だに不明のままである。上皮細胞において、AMPK の上流キナーゼの 1 つである LKB1 は細胞に加わるメカニカルストレスに反応してカドヘリン—カテニン複合体にリクルートされ、AMPK を活性化およびリクルートすることが報告されている [53][54]。また、心臓において、個々の心筋細胞は自拍動によるメカニカルストレスに常に晒されており、適切なメカニカルストレスは心臓の機能・正常な発達・恒常性維持に必要不可欠である。細胞に加わるメカニカルストレスが低下した状態が長期間続くと、心筋細胞の萎縮や細胞死が引き起こされる [43]。さらに、介在板は心臓におけるメカノセンシングの中心的な場であるという報告もある [39]。

そこで、メカニカルストレスが与える AMPK の活性および局在への影響を検討するため、心筋細胞の収縮を抑制するミオシン ATPase 阻害剤 MYK-461 を処理した新生仔ラット心筋細胞において、AMPK の活性の指標であるリン酸化 AMPK の免疫染色を行った。その結果、MYK-461 添加後 2 時間で、細胞接着部位のリン酸化 AMPK シグナルは有意に減少した (Figure.4a)。この時、アドヘレンスジャンクションの構成分子である N-カドヘリンには変化は見られなかった。その後、MYK-461 を洗浄したところ、4 時間後には細胞接着部位にリン酸化 AMPK シグナルが復活した (Figure.4a)。さらに、拍動阻害による total の AMPK への影響を検討したところ、細胞接着部位の total の AMPK シグナルもまた MYK-461 の 2 時間処理により減少し、MYK-461 の洗浄により再局在を認めた (Figure.4b)。一方で、細胞接着のその他の構成分子である Connexin43 や Plakoglobin の局在は、MYK-461 処理により変化しなかった (Figure.4c)。興味深いことに、AMPK と同様に細胞接着部位に局在する LKB1 は、MYK-461 処理により僅かに減少したが、AMPK ほどの変化は見られなかった (Figure.4d)。また、MYK-461 を 4 時間処理した心筋細胞において、微小管の構成分子である α -Tubulin を免疫染色法により観察したところ、Control と比較して α -Tubulin が増加していることを見出した (Figure.4e)。これらの結果から、AMPK の局在は心筋細胞の拍動に応じて制御されていることが示された。





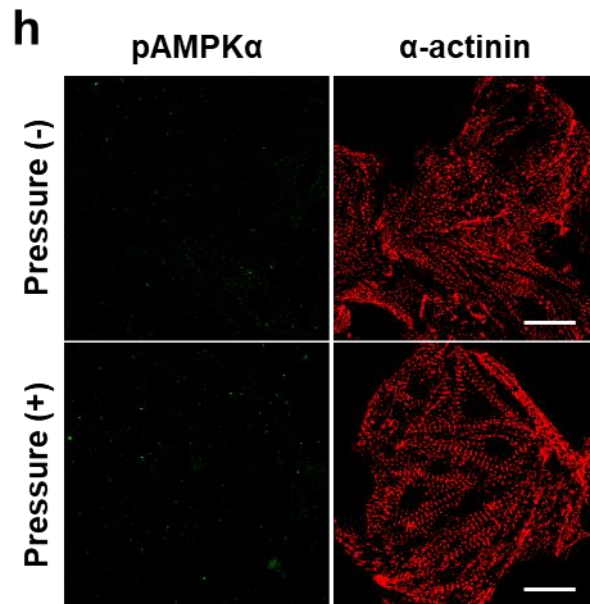


Figure.4 拍動によるメカニカルストレスの AMPK への影響の検討

(a)-(d) ミオシン ATPase 阻害剤 MYK-461 処理により拍動を抑制した心筋細胞において、細胞免疫染色法により (a)リン酸化 AMPK (pAMPK α)、(b) total AMPK (AMPK β 2)、(c) Connexin43 および Plakoglobin、(d) LKB1、(e) α -Tubulin の観察を行った。(f)-(g) 細胞免疫染色法と IN Cell Analyzer 6000 を用いた画像データ解析を組み合わせ、拍動阻害による細胞面積への影響を検討した。(f)Control および MYK-461 を処理した心筋細胞の α -actinin の染色像。1 つ 1 つの細胞を ROI (黄色線)で囲み、細胞面積を測定した。(g)通常的心筋細胞に加えて、CLIP-170 WT/ S311A mutant/ S311D mutant を発現させた心筋細胞においても拍動阻害による細胞面積への影響を検討した (Control: n=784, MYK-461: n=939, CLIP WT: n=656, CLIP WT+MYK: n=619, CLIP S311D: n=613, CLIP S311D+MYK: n=735, CLIP S311A: n=389, CLIP S311A: n=508)。(h)細胞免疫染色法により圧負荷刺激の AMPK への影響を検討した。Scale bar : 5 μ m (a-d)、20 μ m (e, h)。(g): Data means \pm S.D. **, P<0.01 vs Control, ††, P<0.01 vs CLIP WT by Tukey's multiple comparisons test, one-way ANOVA.

4-4-2 拍動阻害剤処理による心筋細胞の拡大

さらに、MYK-461 処理により拍動を抑制した心筋細胞を観察する中で、生理的な表現型として個々の細胞面積が拡大している可能性を見出した。そこで、心筋細胞において AMPK-CLIP-170 シグナルが微小管の動的不安定性を調節することで細胞の形を制御していると仮説を立て、さらなる検討を行った。MYK-461 を処理した心筋細胞の細胞面積の変化を調べるため、免疫染色と IN Cell Analyzer 6000 を用いた画像データ解析を組み合わせで行った。その結果、MYK-461 処理により心筋細胞の細胞面積の有意な増加を認めた (Figure.4f, g)。さらに、この現象における AMPK による CLIP-170 の 311 番目のリン酸化の意義を検証するため、CLIP-170 WT、CLIP-170 S311A mutant、および 311 番目のセリンをアスパラギン酸に置換した恒常的リン酸化 mutant である CLIP-170 S311D mutant を導入した心筋細胞において表現型を比較した。CLIP-170 WT を発現させた心筋細胞では、拍動阻害により細胞面積が増加した (Figure.4g)。また、CLIP-170 S311A を発現させた心筋細胞は、MYK-461 を処理せずとも細胞面積の増大が見られた (Figure.4g)。一方、CLIP-170 S311D を発現させた心筋細胞では、MYK-461 処理による細胞面積の拡大が抑えられた (Figure.4g)。これらの結果から、細胞接着部位への AMPK の局在および AMPK による CLIP-170 のリン酸化が適切な細胞の大きさを保つために重要であり、AMPK がメカノセンシングの機能因子である可能性が示唆された。

4-5 圧負荷による AMPK 活性への影響の検討

常に拍動する心臓組織において、心筋細胞にかかる力学的刺激として拍動によるメカニカルストレスの他に、心内腔からかかる圧負荷が考えられる。心筋細胞における AMPK の局在維持に必要な力学的刺激について検討を加えるため、大阪大学大学院工学研究科 機械工学専攻 知能機械部門の金子真教授・伊藤弘明先生にご協力いただき、MYK-461 処理により拍動を抑制した心筋細胞に圧負荷を加えてリン酸化 AMPK の局在を免疫染色法により観察した。その結果、圧負荷刺激によるリン酸化 AMPK の細胞接着部位への復活は認められなかった (Figure.4h)。圧負荷刺激により α -actinin 抗体により染色したサルコメア構造の成熟および心筋細胞の圧負荷応答である肥大化が見られたことから、圧負荷が適切にかかっていることは確認できた。すなわち、心筋細胞における AMPK 局在の維持に圧負荷の関与は否定的である。また圧負荷刺激により BNP の mRNA 発現上昇やサルコメアの成熟など肥大反応は認められ、心筋細胞において異なる力学的刺激応答の存在が示唆された。

4-6 生細胞タイムラプスイメージングによる AMPK 活性動態の解析

4-6-1 AMPK/BRSK activity reporter (ABKAR) の検証実験

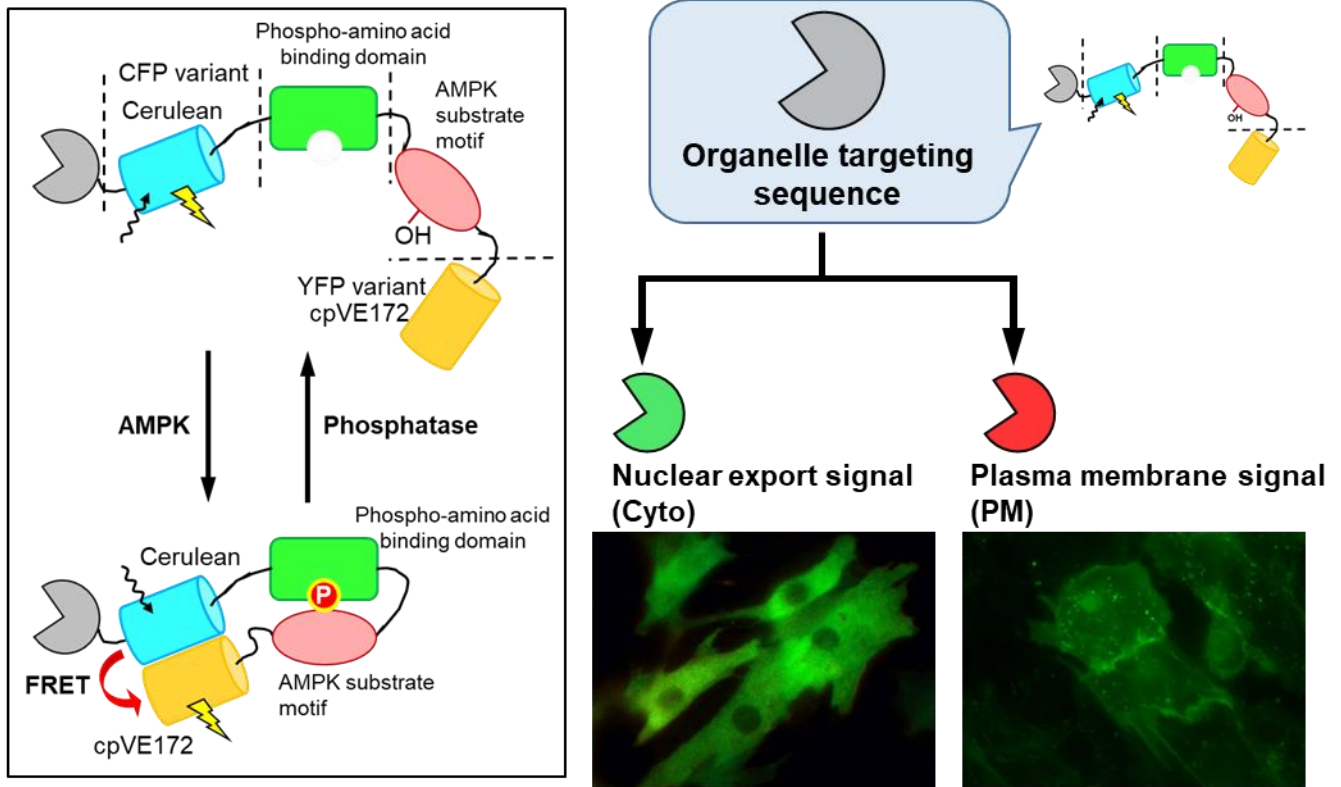
メカニカルストレスの AMPK 活性への影響をさらに検討するため、AMPK の活性レベルをライブで可視化し定量化することができる FRET ベースのバイオセンサーである AMPK/BRSK activity reporter (ABKAR)を用いて AMPK の活性動態を観察した (Figure.5a)。新生仔ラット心筋細胞において AMPK の活性レベルを細胞接着部位と細胞質とで分けて観察するため、ABKAR に核外移行シグナルおよび細胞膜移行シグナルを付けた、Cytosol targeting ABKAR (Cyto-ABKAR)および Plasma membrane targeting ABKAR (PM-ABKAR)を作製した (Figure.5a)。新生仔ラット心筋細胞および HeLa 細胞に Cyto-ABKAR および PM-ABKAR を発現させ、ABKAR が AMPK 活性レベルを測定できるかの検証を行った。解糖系の阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose (2DG)および電子伝達系の阻害剤である Oligomycin A (Oligo) を用いて、ATP レベルを低下させることによる AMPK の活性化を観察したところ、心筋細胞・HeLa 細胞共に AMPK が活性化されていることを確認できた (Figure.5b, c)。また、ATP レベルをリアルタイムでモニタリングすることができる FRET ベースの ATP indicator である Ateam を用いて、2DG+Oligo 処理により細胞膜および細胞質において ATP レベルが低下していることを確認した (Figure.5b, c)。ABKAR を用いて観察した 2DG+Oligo 処理による AMPK 活性の変化には、HeLa 細胞と心筋細胞、PM と Cyto の間で感受性の違いが見られ、細胞種間や細胞内の部位により AMPK 活性制御に違いがある可能性が示唆された。

また、通常時の HeLa 細胞および心筋細胞の細胞接着部位および細胞質での AMPK 活性を測定し比較したところ、どちらの細胞においても細胞質と比べて細胞接着部位での AMPK 活性が有意に高かった (Figure.5d, e)。さらに、同じ細胞接着部位での AMPK 活性であっても、HeLa 細胞と比べて心筋細胞の細胞接着部位の AMPK 活性の方が顕著に高いという結果が得られた (Figure.5d, e)。これらの結果は、心筋細胞の細胞接着部位にリン酸化 AMPK が局在する免疫染色のデータを裏付けるものであった。

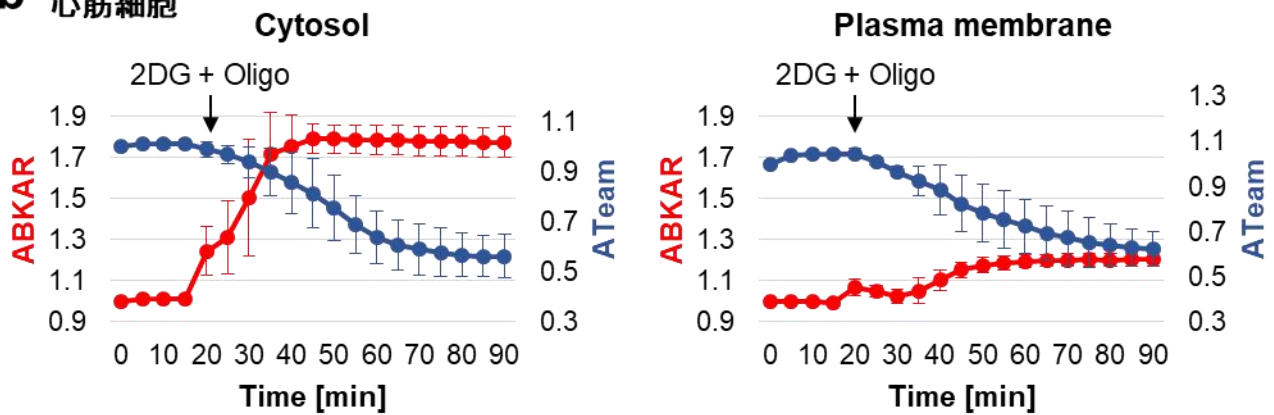
4-6-2 拍動を抑制した心筋細胞での AMPK 活性レベルの測定

拍動抑制による AMPK の局在変化の影響を経時的に評価するため、PM-ABKAR を用いてタイムラプスイメージングを試みた。しかしながら、MYK-461 処理により拍動を抑制した心筋細胞において、細胞接着部位での AMPK の局在変化による AMPK 活性の低下は観察されなかった (Figure.5f)。また、AMPK の阻害剤である Compound C を処理した心筋細胞においても同様に AMPK 活性の低下が認められず (Figure.5f)、バックグラウンドの高さが問題となっている可能性が示唆された。

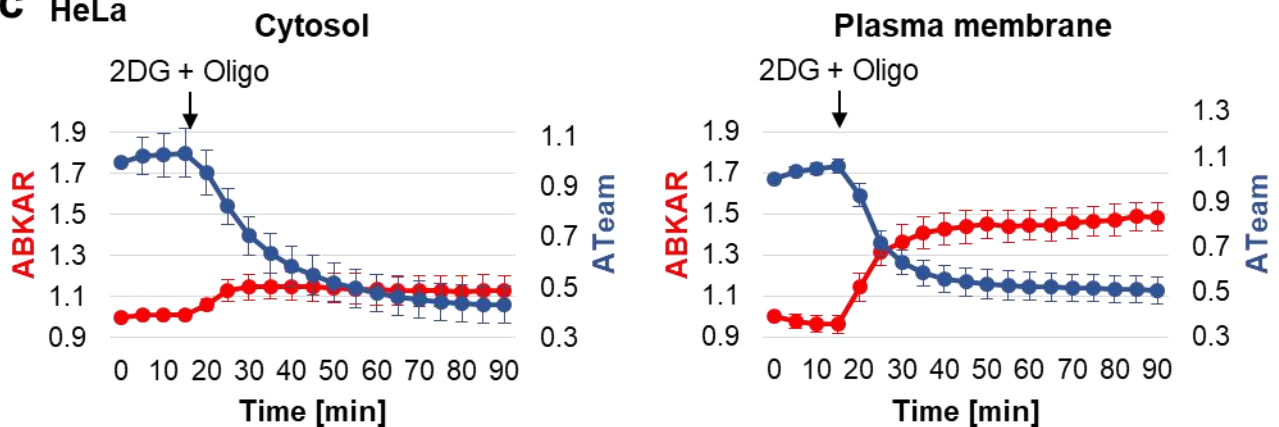
a FRET-based biosensor for AMPK (**ABKAR**)



b 心筋細胞



c HeLa



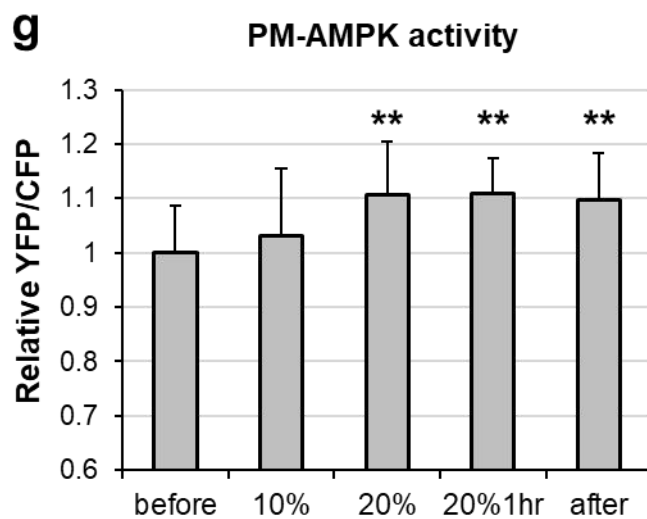
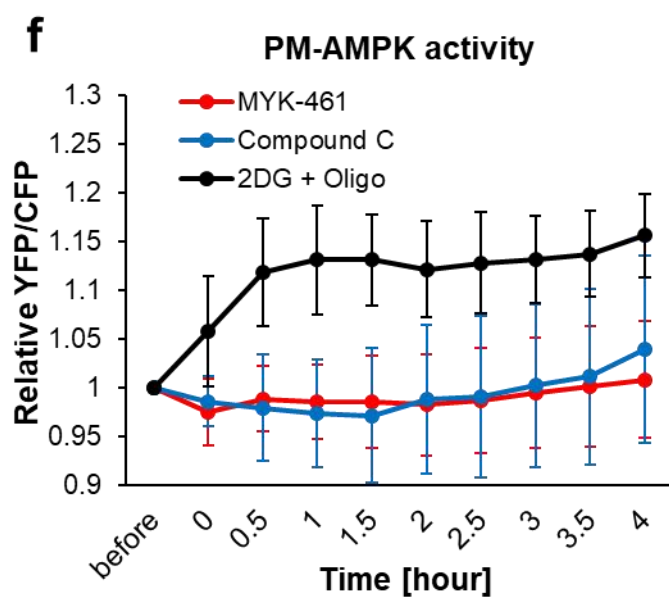
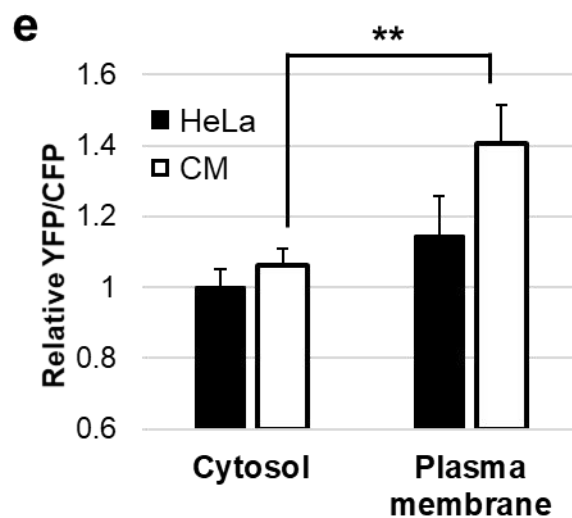
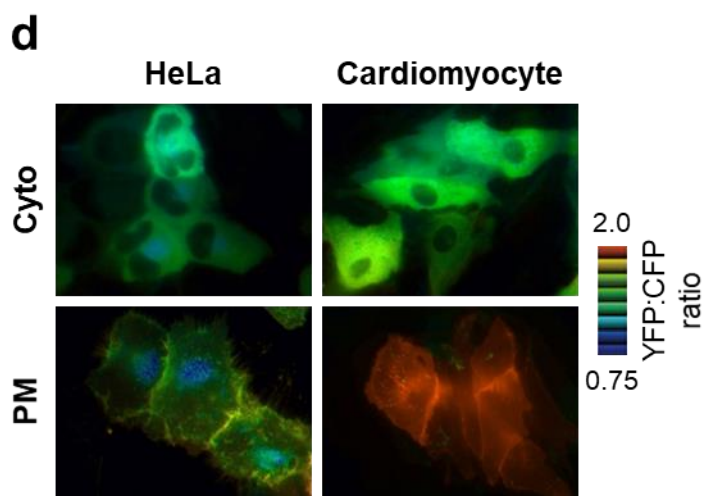


Figure.5 AMPK 活性バイオセンサーABKAR を用いた検証

(a) ABKAR の scheme 図。AMPK により Substrate motif がリン酸化を受けると、構造に変化が生じ FRET が起こる。YFP/CFP 比から AMPK 活性レベルを測定できる。AMPK 活性レベルを細胞接着部位と細胞質とで分けて観察するため、ABKAR に核外移行シグナルおよび細胞膜移行シグナルを付けた、Cytosol targeting ABKAR (Cyto-ABKAR) / Plasma membrane targeting ABKAR (PM-ABKAR) を作製した。(b) 心筋細胞および(c) HeLa 細胞に Cyto-ABKAR / PM-ABKAR / Cyto-ATea / PM-Ateam を発現させ、ABKAR が AMPK 活性レベルを測定できるかの検証を行った (2DG: 10 mM, Oligo: 0.01 μ g/ml)。(d-e) 通常時の HeLa 細胞・心筋細胞の細胞接着部位および細胞質での AMPK 活性を測定し比較した。(f) MYK-461 処理および AMPK 阻害剤 Compound C 処理を行った心筋細胞において、AMPK 活性を測定した (MYK-461: 2 μ M, Compound C: 20 μ M, 2DG: 10 mM, Oligo: 0.01 μ g/ml)。(g) 伸展刺激による AMPK 活性の変化を PM-ABKAR を用いて観察した。(e): Data Means \pm S.D. **, $P < 0.01$ vs Cytosol (CM: Cardiomyocyte), by Tukey's multiple comparisons test, one-way ANOVA. (g): Data Means \pm S.D. **, $P < 0.01$ vs before, by Tukey's multiple comparisons test, one-way ANOVA.

4-6-3 伸展刺激装置を用いたメカノストレスによる AMPK 活性への影響の検討

次に、メカニカルストレスの AMPK 活性への影響を経時的に検討するため、シリコンチャンバー上に播種した細胞に伸展刺激装置を用いて外部から人工的にメカニカルストレスを与える実験系を構築し、伸展刺激による細胞接着部位の AMPK 活性の変化を PM-ABKAR を用いて観察した。その結果、伸展刺激した心筋細胞の細胞接着部位において、リン酸化 AMPK の増加が確認され、細胞接着部位にかかるメカニカルストレスにより細胞接着部位の AMPK が活性化されることを明らかにした (Figure.5g)。

4-7 AMPK による CLIP-170 のリン酸化の生体内での意義の検討

4-7-1 CLIP-170 (S311A / S311D) 心臓特異的強制発現マウスの作製および解析

AMPK による CLIP-170 のリン酸化の生体内での意義を検討するために、human CLIP-170 の S311A mutant を心臓特異的に強制発現させるタモキシフェン誘導型トランスジェニックマウスを作製した (Figure.6a)。タモキシフェン投与により CLIP-170 S311A mutant の発現を誘導した CLIP-170 S311A マウスにおいて、CLIP-170 S311A mutant の強制発現による心機能への影響を検証するため、心エコーによる心機能の経時観察を行った。タモキシフェン投与開始から 8 週間で CLIP-170 S311A マウスは、コントロールと比較して心機能の指標である左室内径短縮率(fractional shortening)の有意な低下を認めた (Figure.6b)。さらに、タモキシフェン投与後 1 年以上経過した CLIP-170 S311A mutant マウスでは、さらなる心機能の悪化が見られた (Figure.6b)。

また、マッソン・トリクローム染色により CLIP-170 S311A マウスの心臓を組織学的に評価したところ、タモキシフェン投与から 3 ヶ月経過した CLIP-170 S311A マウスでは心機能の顕著な低下は見られたものの組織変性は認められなかったが、タモキシフェン投与後 1 年以上経過した CLIP-170 S311A マウスでは、線維化を伴った組織変性を認め、統計的にも有意な結果を得た (Figure.6d, e)。また、微小管の構成分子である α -Tubulin を免疫組織染色法により観察したところ、CLIP-170 S311A マウスの心筋組織において α -Tubulin の増加を認めた (Figure.6f)。さらに、CLIP-170 S311A mutant の強制発現による介在板の超微細構造への影響を評価するため、電子顕微鏡による観察を行ったところ、タモキシフェン投与後 1 年以上経過した CLIP-170 S311A マウスにおいて、介在板構造の乱れが見られた (Figure.6g)。

また、新生仔ラット心筋細胞で CLIP-170 S311A mutant の強制発現により見られた細胞拡大の表現型が *in vivo* においても同様に見られるか検証するため、心機能の低下した CLIP-170 S311A マウスの心臓において、個々の細胞の大きさをコムギ胚芽凝集素

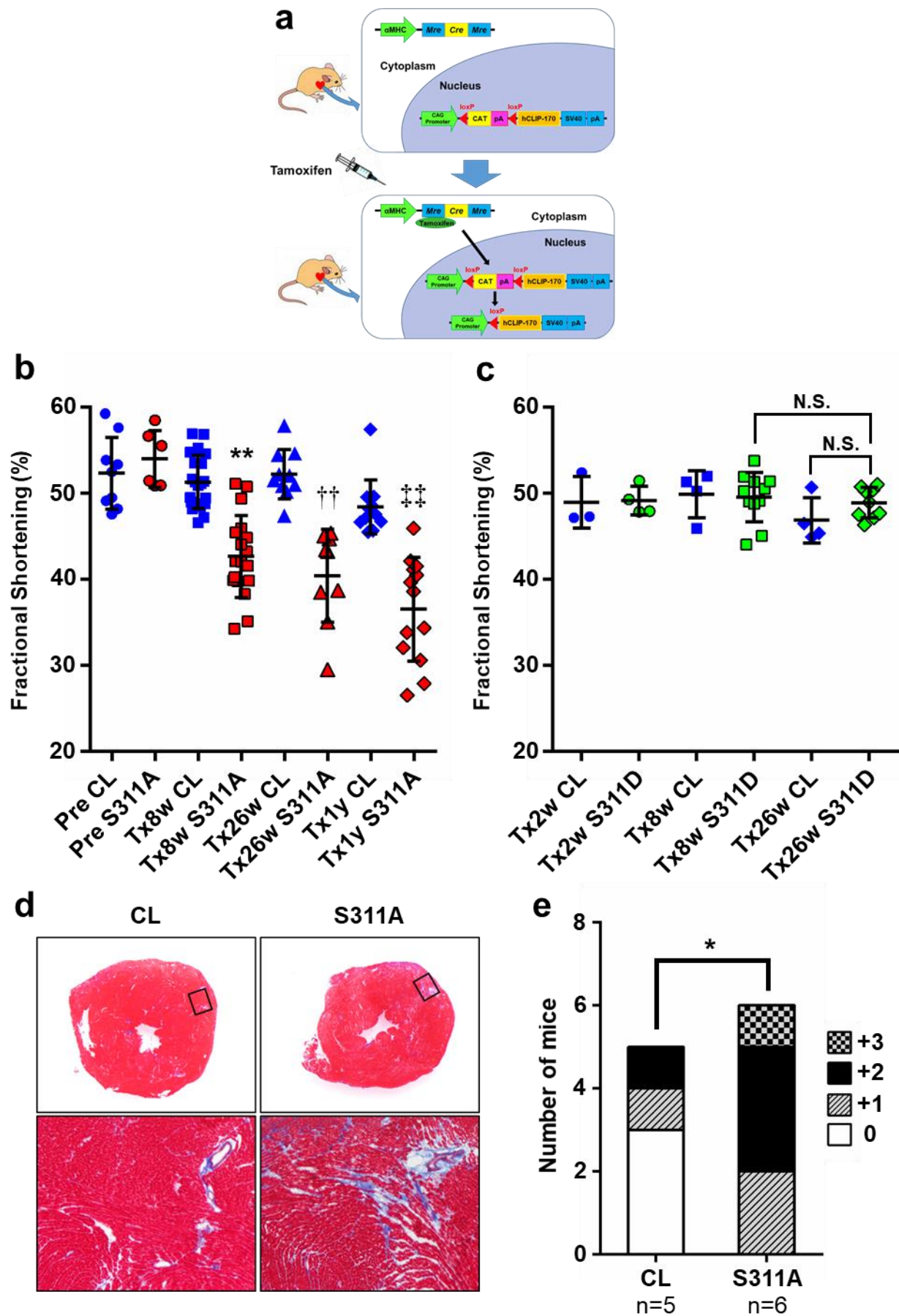
(WGA) を用いた組織免疫染色法により評価した。その結果、コントロールと比較して CLIP-170 S311A マウスでは、細胞が長軸方向に伸びていることを見出した(Figure.6h, i)。

さらに、エコーでは評価することができない心臓の右室の動きを精密に評価するため、大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻 医療技術科学分野 医用物理工学講座の斎藤茂芳先生のご協力のもと心臓 MRI による CLIP-170 S311A マウスの心臓収縮の正確な定量化を行った。CLIP-170 S311A マウスでは、コントロールと比較して左室だけでなく右室の拡張および収縮能の低下を認めた (Figure.6j)。

また、恒常的リン酸化モデルとして CLIP-170 S311D マウスを作製したところ、コントロールと比較して心機能に差は見られなかった(Figure.6c)。

4-7-2 CLIP-170 S311A mutant 病態モデルマウスの作製および解析

さらに、AMPK-CLIP-170 シグナルの病態生理学的意義を解明するため、抗がん剤として広く使われ副作用として心毒性を持つドキソルビシンの投与により病態モデルを作製した。8 週齢の成獣マウスにおいてタモキシフェン投与により CLIP-170 S311A mutant の発現を誘導し、その後にドキソルビシンの投与を行い、タモキシフェン投与から 10 週で心エコーによる心機能の評価を行った。その結果、ドキソルビシン投与により心不全を誘発した CLIP-170 S311A マウスでは、コントロールに比べて顕著な心機能の低下が見られた (Figure.7a)。この結果は、タモキシフェン投与から 1 年以上自然経過した CLIP-170 S311A マウスの心機能と同等の値であった。また、ドキソルビシンを投与した CLIP-170 S311A mutant マウスでは、心機能の低下だけでなく、線維化を伴う組織変性も認め、統計的にも有意な結果を得た(Figure.7b, c)。さらに、心臓 MRI による評価を行ったところ、タモキシフェン投与から 1 年以上自然経過した CLIP-170 S311A マウスと同様に右室の拡張が認められた(Figure.7d)。



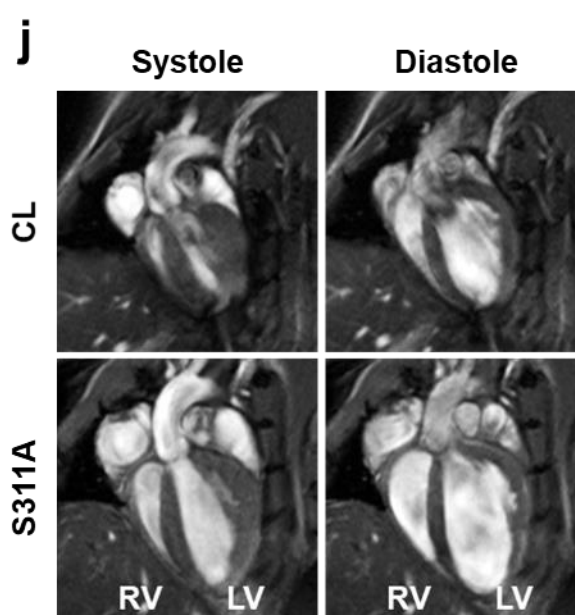
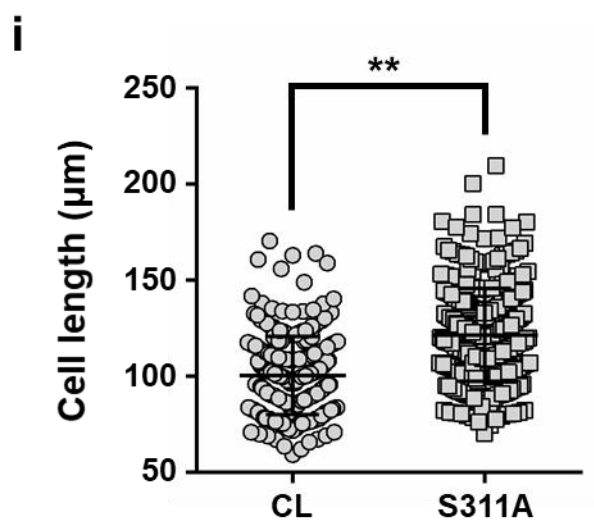
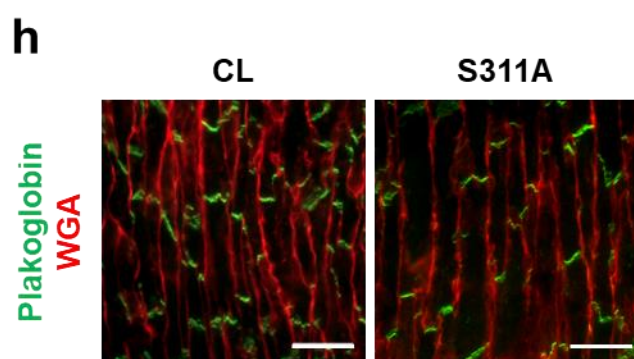
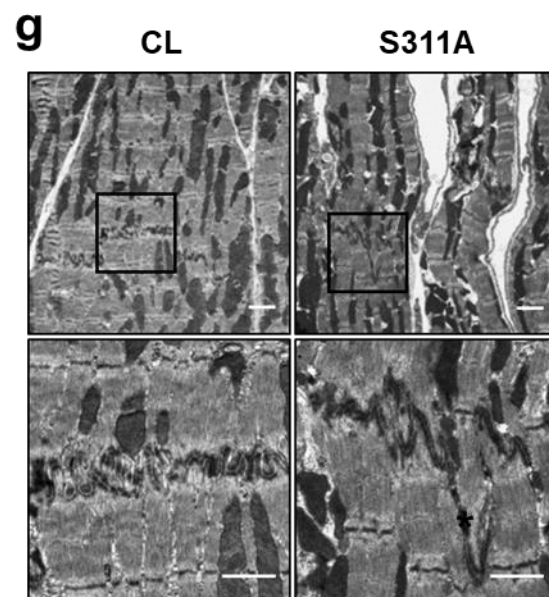
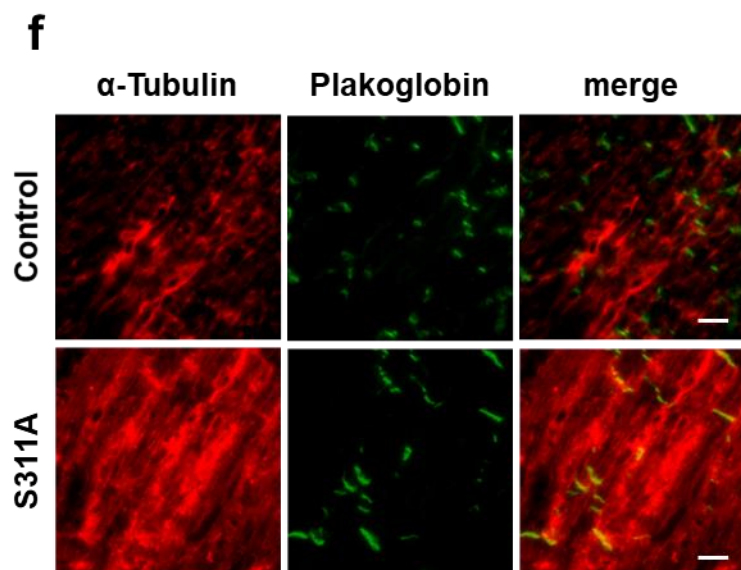


Figure.6 CLIP-170 S311A および S311D 心臓特異的強制発現マウスの解析

(a) Tamoxifen (Tx) 誘導型 CLIP-170 心臓特異的強制発現マウスを作製した。タモキシフェン投与により、細胞質に発現している Mer-Cre-Mer が核へ移行し、loxP で挟まれた配列を取り除く。その結果、CLIP-170 の発現が誘導される。(b, c) Tx 投与前 (Pre)、投与 2 週後 (Tx2w)、8 週後 (Tx8w)、26 週後 (Tx26w)、1 年後 (Tx1y) に心エコーを行った。心機能の評価には、左室内径短縮率 (fractional shortening) を用いた。Control mouse (CL) には、Mer-Cre-Mer のみ、および CAT のみ発現している CLIP-170 S311A および S311D マウス (S311A/S311D) の同腹仔を用いた。(d, e) マッソン・トリクローム染色により CLIP-170 S311A マウスの心臓を組織学的に評価した(スケーリングクラス: 0, +1, +2, +3; 0: perivascular fibrosis のみで Interstitial fibrosis がない, +1: Interstitial fibrosis が少しある, +2: Interstitial fibrosis が局所的に +1 以上ある, +3: Interstitial fibrosis が広範囲に多くある、もしくは +2 相当が複数箇所みられる)。(f) Tx 投与 1 年後の CLIP-170 S311A マウスの心臓において、 α -Tubulin を免疫組織染色法により観察した。(g) 電子顕微鏡により CLIP-170 S311A マウスの心臓介在板の超微細構造を観察した(*: 介在板の乱れ)。(h, i) Tx 投与 1 年後の CLIP-170 S311A マウスの心臓において、個々の細胞の長さをコムギ胚芽凝集素 (WGA) を用いた組織免疫染色法により評価した (CL: n=259, S311A: n=326)。(j) 心臓 MRI により CLIP-170 S311A マウスの心臓収縮の正確な定量化を行った (Systole: 収縮期、Diastole: 拡張期、RV: 右心室、LV: 左心室)。Scale bars: 1 μ m (g 下段)、2 μ m (g 上段)、20 μ m (f)、50 μ m (h)。(b): Data means \pm S.D. **, P<0.01 vs Tx8w CL, ††, P<0.01 vs Tx26w CL, ‡‡, P<0.01 vs Tx1y CL, by Tukey's multiple comparisons test, one-way ANOVA. (e): Data means \pm S.D. *, P<0.05, by Cochran-Armitage trend test. (i): Data means \pm S.D. **, P<0.01 vs CL by Student t-test.

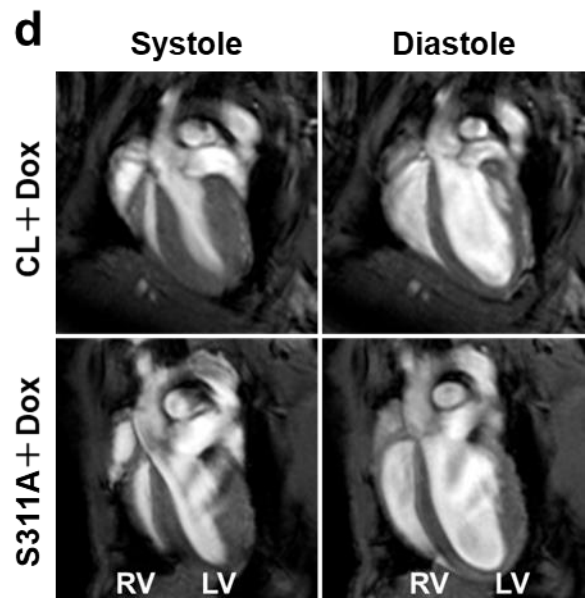
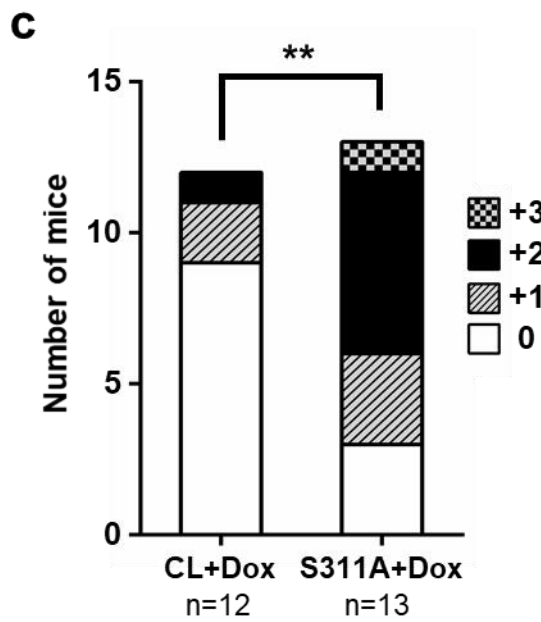
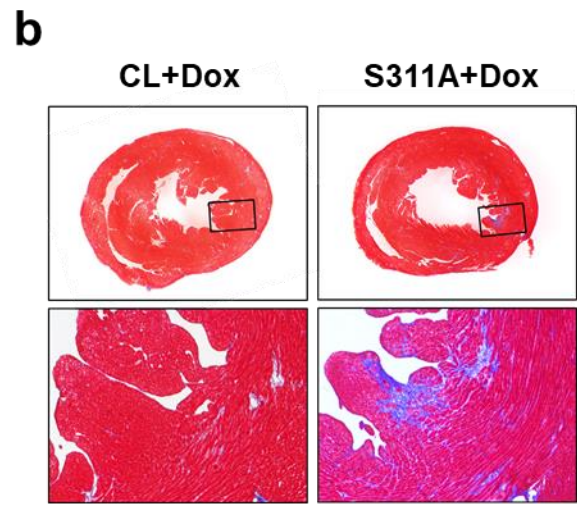
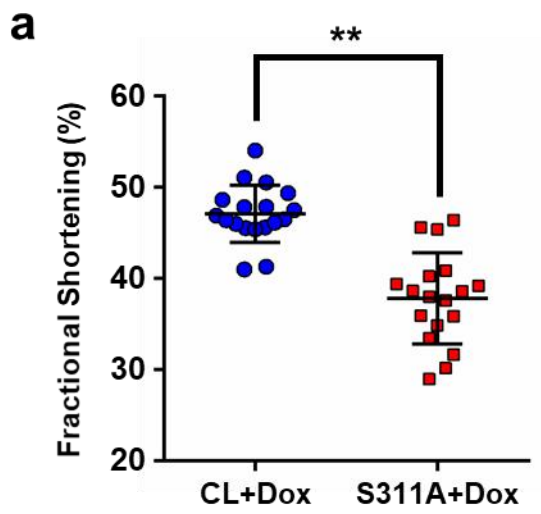


Figure.7 ドキソルビシンによる CLIP-170 S311A 病態モデルマウスの解析

ドキソルビシン (Dox)投与により病態モデルを作製した。(a)タモキシフェン投与から 10 週、Dox 投与から 8 週で心エコーによる心機能の評価を行った。Control mouse (CL)には、Mer-Cre-Mer のみ、および CAT のみ発現している CLIP-170 S311A および S311D マウス (S311A/S311D)の同腹仔を用いた。(b, c)マッソン・トリクローム染色により Dox 投与 CLIP-170 S311A マウスの心臓を組織学的に評価した(スケーリングクラス : 0, +1, +2, +3, 0: perivascular fibrosis のみで Interstitial fibrosis がない, +1 : Interstitial fibrosis が少しある, +2 : Interstitial fibrosis が局所的に+1 以上ある, +3 : Interstitial fibrosis が広範囲に多くある、もしくは+2 相当が複数箇所みられる)。(d)心臓 MRI により Dox 投与 CLIP-170 S311A マウスの心臓収縮の正確な定量化を行った (Systole: 収縮期、Diastole: 拡張期、RV: 右心室、LV: 左心室)。(a): Data means \pm S.D. **, $P<0.01$ vs CL by Student t-test. (c): Data means \pm S.D. **, $P<0.01$, by Cochran-Armitage trend test.

5 考察

本研究では、心臓での AMPK-CLIP-170 シグナルの生理的意義を解明するため、特に AMPK による CLIP-170 のリン酸化を介した微小管の動的制御、および細胞間接着部位 (介在板) における AMPK 活性制御に注目した。

細胞骨格の 1 因子として重要な微小管は、これまで心臓では静的なイメージでとらえられてきた。本研究では、細胞接着を形成している心筋細胞において長辺側ではなく介在板にむかって伸長し、介在板で turn over する微小管の動的な動きをタイムラプス観察により世界で初めて見出した。さらに、エネルギー代謝調節因子として重要な役割を持つ AMPK が、心筋細胞において CLIP-170 のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を制御し、細胞の形を調節する重要な因子である可能性を初めて示した。最近、単一細胞レベルでの解析ではあるが心筋細胞において微小管の安定性が心筋の収縮性を調節しているという報告がなされ [50]、心筋細胞において微小管と収縮性との関連が明らかにされた。しかしながら、心筋細胞において微小管と細胞の形状との関連については、これまで検討されていない。また、単一細胞レベルの解析ではなく、細胞接着部位に着目した多細胞レベルでの解析でしか見えないものを見るという点が本研究の特色である。

さらに本研究では、これまで知られているエネルギーセンサーとしての AMPK 活性とは異なり、心筋細胞において拍動による力学的刺激が AMPK を介在板に局在させ、その局在制御により空間的な活性調節が司られることを初めて明らかにした。心筋細胞では、恒常的に AMPK を介在板へ局在させることで、細胞の内側から介在板へ向けて伸長し turn over する微小管の動態を、CLIP-170 のリン酸化を介して制御し、細胞の形態を維持していると推察される。AMPK と力学的刺激の関係について、骨格筋細胞において伸展刺激により AMPK が活性化されるという報告がある [55] が、AMPK の局在については言及されていない。本研究では、心筋細胞において拍動由来のメカニカルストレスが、単純に AMPK を活性化しているのではなく、AMPK を細胞接着部位に局在・維持させることで、その活性を制御していることを初めて明らかにした。AMPK は数多くの基質を持ち、細胞生物学的に多様な役割を果たしているが、このマルチタスクを実現しているのはサブユニットの組み合わせや細胞内での局在であると考えられている [56]。熱、エネルギー枯渇、酸化などのストレスに対する応答として、AMPK が細胞質から核に移動することも過去に示されている [57]が、本研究結果はストレス応答のような一過性の現象ではなく、力学的刺激により AMPK を介在板に局在させ維持するという恒常的な現象であった。心筋細胞では、AMPK を恒常的に介在板へ局在させることで CLIP-170 に対する基質特異性を高めていると考えられる。

また、乳腺上皮細胞において、水流によるズリ応力や磁気ビーズを用いた細胞膜上の E-カドヘリンへの力学的刺激により、LKB1 が細胞膜へリクルートされ、AMPK の細胞膜へのリクルートおよび活性化が起こり、AMPK は E-カドヘリンとの相互作用を示すという報告がある [53][54]。しかしながら、上皮細胞における apical、basal、lateral 面のどの細胞膜分画かは検討されておらず、本研究で示したような介在板という極性を伴った AMPK の局在が、心筋細胞特異的な現象かどうかは今後さらに検討していく必要がある。また、拍動阻害剤を用いた免疫染色の実験から、力学的刺激の直下に AMPK があるのではなく、カドヘリンのような膜タンパク質への刺激やアダプタータンパク質のリクルートなど、いくつかのプロセスの下流に AMPK 局在制御があることが予想される。メカノシグナルと AMPK 局在制御の間に多くのプロセスがあることは、拍動抑制による介在板での AMPK 消失および洗浄操作による局在復活に時間を要することから推測される。

AMPK-CLIP-170 シグナルの生体内での生理的意義を解明するため、AMPK によるリン酸化を受けない CLIP-170 S311A mutant を心臓特異的に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製したところ、心機能の有意な低下だけでなく、線維化を伴った組織変性や介在板の構造異常が見られた。一方で、個々の心筋細胞の肥大は認められなかったが、細胞は長軸方向に長くなりアスペクト比が増加しており、左心室・右心室共に拡張していることを認めた。心臓に負荷が持続的にかけると、心臓リモデリングと呼ばれる現象が起こる。例えば、高血圧症により心室に圧負荷がかかると、負荷に対抗して収縮を維持するために心室は肥大化する [40][41]。同時に、負荷に対抗して心筋組織の構造を維持するために血管周辺にて反応性の線維化が起こる。一方で、心筋虚血や慢性的な炎症により心筋細胞の萎縮や脱落が起こり、それを埋める形で置換性の線維化が起こる [43][58][59]。心筋細胞は、細胞外環境が適切な硬さであれば 7 : 1 のアスペクト比で、細胞外環境が硬い病的な状態であれば 2 : 1 のアスペクト比で最大の収縮力を発揮することが報告されており、病的な線維化が進行した不全心では細胞外環境が硬くなるため、通常の 7 : 1 のアスペクト比やあるいはそれ以上のアスペクト比では心筋収縮力の低下が引き起こされる [42]。すなわち、本研究にて作製した CLIP-170 S311A マウスでは、AMPK-CLIP-170 シグナルによる微小管の動的不安定性制御の破綻により心筋細胞のアスペクト比が増加することで、収縮力の低下が生じたものと示唆される。一方で、収縮力が低下した状態が続いても代償性の肥大が起こらなかったことから、AMPK-CLIP-170 シグナルによる微小管の動的不安定性制御が心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが推測される。したがって、微小管の動的不安定性制御を介して介在板における AMPK-CLIP-170 シグナルが心臓の適応機能の根幹を担っているのではないかと示唆される。しかしながら、本研究のみでは十分とは言えず、今後

CLIP-170 S311A mutant の強制発現により起こる心機能の低下および線維化のメカニズムについて更なる検証が必要である。

6 結言

心筋細胞の介在板において、AMPK がメカノセンシングの機能分子としてメカニカルストレスを感知し局在を維持することで、CLIP-170 のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を調節し、細胞の形態を制御している可能性を明らかにした。さらに、この AMPK-CLIP-170 シグナルによる微小管の動的制御機構が心機能の維持や心疾患の病態形成に重要であることが示唆された。

今後、本研究で明らかにした心臓微小管の動的制御機構に介入する新規治療法の開発に繋がることが期待される。

7 参考文献

- [1] Carling, D., Zammit, V.A., & Hardie, D.G. (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis, *FEBS Letters.*, 223,217-222.
- [2] Yeh, LA., Lee, KH., Kim, KH. (1980) Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge, *J Biol Chem.*, 255(6):2308-14.
- [3] Hardie DG., (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(10):774-85.
- [4] Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.*, 29, 18-24
- [5] Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG., (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism., *Cell Metab.*, 1(1):15-25.
- [6] Mirouse V, Swick LL, Kazgan N, St Johnston D, Brenman JE., (2007) LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress., *J Cell Biol.*, 177(3):387-92.
- [7] Zheng B, Cantley LC., (2007) Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase., *Proc Natl Acad Sci.*, 104(3):819-22.
- [8] Martin SG, St Johnston D., (2003) A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity., *Nature.*, 421(6921):379-84.
- [9] Tyisha Williams, Jay E. Brenman. (2008) LKB1 and AMPK in cell polarity and division, *Trends in Cell Biol.*, 18, 4, 193-198
- [10] Kirschner M, Mitchison T., (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis., *Cell.*, 45(3):329-42.

- [11] Desai A, Mitchison TJ., (1997) Microtubule polymerization dynamics., *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13:83-117.
- [12] Hirokawa N, Noda Y., (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics., *Physiol Rev.*, 88(3):1089-118.
- [13] Lü B, Gong Z, Wang J, Zhang J, Liang J., (2007) Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots., *J Exp Bot.*, 58(10):2565-72.
- [14] Smertenko A, Dráber P, Viklický V, Opatrný Z., (1997) Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells., *Plant Cell Environ.*, 20: 1534-1542.
- [15] Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA., (2011) Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction., *Nature.*, 475(7356):316-23.
- [16] Mitchison T, Kirschner M. (1984) Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, 312(5991):232-7.
- [17] Mitchison T, Kirschner M., (1984) Dynamic instability of microtubule growth., *Nature.*, 312(5991):237-42.
- [18] Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED. (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.*, 107, 1437-1448
- [19] Carsten Janke (2014) The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions, *J Cell Biol.*, 206, No. 4, 461–472
- [20] Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R., (1977) Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin., *FEBS Lett.*, 73(2):147-50.
- [21] LeDizet M, Piperno G., (1987) Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin., *Proc Natl Acad Sci.*, 84(16):5720-4.

- [22] Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H., (2017) Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics., *Int J Mol Sci.*, 18(10), 2207.
- [23] Bieling P, Laan L, Schek H, Munteanu EL, Sandblad L, Dogterom M, Brunner D, Surrey T., (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro., *Nature.*, 450(7172):1100-5.
- [24] Akhmanova A, Steinmetz MO., (2015) Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 16(12):711-26.
- [25] Margolis RL, Wilson L., (1981) Microtubule treadmills--possible molecular machinery., *Nature.*, 293(5835):705-11.
- [26] Carvalho P, Tirnauer JS, Pellman D., (2003) Surfing on microtubule ends., *Trends Cell Biol.*, 13(5):229-37.
- [27] Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo., *Cell.*, 96(4): 517-27.
- [28] Anna Akhmanova, Casper C Hoogenraad. (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 47-54
- [29] Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., Kaibuchi, K. (2002) Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170, *Cell*, 109, 873-885
- [30] Nakano, A., Kato, H., Watanabe, T., Min, K.D., Yamazaki, S., Asano, Y., Seguchi, O., Higo, S., Shintani, Y., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Kaibuchi, K., Mochizuki, N., Kitakaze, M., Takashima, S. (2010) AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation, *Nat Cell Biol.*, 12, 583-590
- [31] Troy A. Baudino, Wayne Carver, Wayne Giles, Thomas K. Borg (2006) Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291, 1015-1026

- [32] Noorman M1, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV., (2009) Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling., *J Mol Cell Cardiol.*, 47(1):23-31.
- [33] Vermij SH, Abriel H, van Veen TA., (2017) Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res.*, 113(3):259-275.
- [34] Weidmann S., (1966) The diffusion of radiopotassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle., *J Physiol.*, 187(2):323-42.
- [35] Weidmann S., (1970) Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart., *J Physiol.*, 210(4):1041-54.
- [36] Rohr S., (2004) Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential., *Cardiovasc Res.*, 62(2):309-22.
- [37] Spach MS, Miller WT 3rd, Geselowitz DB, Barr RC, Kootsey JM, Johnson EA., (1981) The discontinuous nature of propagation in normal canine cardiac muscle. Evidence for recurrent discontinuities of intracellular resistance that affect the membrane currents., *Circ Res.*, 48(1):39-54.
- [38] Spach MS., (2003) Transition from a continuous to discontinuous understanding of cardiac conduction., *Circ Res.*, 92(2):125-6.
- [39] Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Mohri S, Naruse K. (2014) TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice., *Nat Commun.*, 5: 3932.
- [40] Borlaug BA, Kass DA., (2009) Invasive hemodynamic assessment in heart failure., *Heart Fail Clin.*, 5(2):217-28.
- [41] Cooper LL, Rong J, Benjamin EJ, Larson MG, Levy D, Vita JA, Hamburg NM, Vasan RS, Mitchell GF. (2014) Components of hemodynamic load and cardiovascular events: The Framingham Heart Study. *Circulation.*, 131(4):354-61.

- [42] McCain ML, Yuan H, Pasqualini FS, Campbell PH, Parker KK. (2014) Matrix elasticity regulates the optimal cardiac myocyte shape for contractility., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 306 (11): H1525-39.
- [43] Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark LC, Reaves PY, Malec KB, McKeown PP, Schocken DD., (1992) Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy., *Circulation.*, 86(2):426-30.
- [44] Gerdes AM, Capasso JM., (1995) Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure., *J Mol Cell Cardiol.*, 27(3):849-56.
- [45] Gerdes, AM. (2002) Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure., *J Card Fail.*, (6 Suppl): S264-8.
- [46] Tsutsui H, Ishihara K, Cooper G 4th. (1993) Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science.*, 260(5108):682-7.
- [47] Tsutsui H, Tagawa H, Kent RL, McCollam PL, Ishihara K, Nagatsu M, Cooper G 4th., (1994) Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes., *Circulation.*, 90(1):533-55.
- [48] Zhang C, Chen B, Guo A, Zhu Y, Miller JD, Gao S, Yuan C, Kutschke W, Zimmerman K, Weiss RM, Wehrens XH, Hong J, Johnson FL, Santana LF, Anderson ME, Song LS (2014) Microtubule-mediated defects in junctophilin-2 trafficking contribute to myocyte transverse-tubule remodeling and Ca²⁺ handling dysfunction in heart failure. *Circulation*, 129, 1742-1750
- [49] Edward T.H. Yeh, Ann T. Tong, Daniel J. Lenihan, S. Wamique Yusuf, Joseph Swafford, Christopher Champion, Jean-Bernard Durand, Harry Gibbs, Alireza Atef Zafarmand, Michael S. Ewer (2004) Cardiovascular Complications of Cancer Therapy Diagnosis, Pathogenesis, and Management., *Circulation*, 109, 3122-3131
- [50] Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, Bogush AI, Chen CY, Margulies KB, Shenoy VB, Prosser BL. (2016) Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes., *Science.*, 352(6284): aaf0659.

- [51] Yokoyama U, Tonooka Y, Koretake R, Akimoto T, Gonda Y, Saito J, Umemura M, Fujita T, Sakuma S, Arai F, Kaneko M, Ishikawa Y. (2017) Arterial graft with elastic layer structure grown from cells., *Sci Rep.*, 7(1): 140.
- [52] Perriard JC, Hirschy A, Ehler E., (2003) Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc?, *Trends Cardiovasc Med.*, 13(1): 30-8.
- [53] Sebbagh M, Santoni MJ, Hall B, Borg JP, Schwartz MA. (2009) Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin., *Curr Biol.*, 19(1):37-42.
- [54] Bays JL, Campbell HK, Heidema C, Sebbagh M, DeMali KA. (2017) Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nat Cell Biol*; 19(6):724-731
- [55] Nakai N, Kawano F, Nakata K (2015) Mechanical stretch activates mammalian target of rapamycin and AMP-activated protein kinase pathways in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biochem*; 406(1-2):285-92
- [56] Miyamoto T, Rho E, Sample V, Akano H, Magari M, Ueno T, Gorshkov K, Chen M, Tokumitsu H, Zhang J, Inoue T (2015) Compartmentalized AMPK signaling illuminated by genetically encoded molecular sensors and actuators. *Cell Rep*; 11(4):657-70
- [57] Kodiha, M., Rassi, J.G., Brown, C.M., and Stochaj, U (2007) Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK—>ERK1/2 pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293, C1427-C1436.
- [58] Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. (1996) Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis., *J Card Fail.*, 2(3): 243-9.
- [59] Kawai C. (1999) From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future., *Circulation.*, 99(8): 1091-100.

8 業績

8-1 原著論文（査読あり）

Yashirogi, S., Shintani, Y., Katayama, T., Takashima, S.

AMPK regulates homeostatic cell shape in cardiomyocytes by modulating microtubule dynamic instability

投稿準備中

Nagao, T., Shintani, Y., Hayashi, T., Kioka, H., Kato, H., Nishida, Y., Yamazaki, S., Tsukamoto, O., Yashirogi, S., Yazawa, I., Asano, Y., Shinzawa-Itoh, K., Imamura, H., Suzuki, T., Suzuki, T., Goto, Y., Takashima, S.

Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder.

FASEB J. in press

Urano, Y., Mori, C., Fuji, A., Konno, K., Yamamoto, T., Yashirogi, S., Ando, M., Saito, Y., Noguchi, N. (2018)

6-Hydroxydopamine induces secretion of PARK7/DJ-1 via autophagy-based unconventional secretory pathway.

Autophagy. 14(11):1943-1958.

8-2 学会・シンポジウム等における発表

(1) 国際会議における発表

1. 著者： ○Shohei Yashirogi、Yasunori Shintani、Seiji Takashima

題名：Regulation of microtubules dynamic instability by AMPK in cardiomyocytes

発表した学会名：3rd European Workshop on AMPK

場所：Ile de Porquerolles, Hyeres, France 年月：2017 年 9 月 （口頭発表、査読あり）

(2) 国内会議における発表

1. 著者： ○矢白木翔平、新谷泰範、高島成二

題名：The analysis of microtubules dynamic instability by AMPK in cardiomyocytes

発表した学会名：第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会

場所：神戸国際展示場 年月：2015 年 12 月 （ポスター発表、査読あり）

2. 著者： ○矢白木翔平、新谷泰範、高島成二

題名：The analysis of microtubules dynamic instability by AMPK in cardiomyocytes

発表した学会名：第 69 回日本細胞生物学会大会

場所：仙台国際センター 年月：2017 年 6 月 (ポスター発表、査読あり)

3. 著者： ○宇山侑希、塚本蔵、矢白木翔平、北浦真生、神窪謙太、高島成二

題名：心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの機能解明

発表した学会名：第 41 回日本分子生物学会大会

場所：パシフィコ横浜 年月：2018 年 11 月 (ポスター発表、査読あり)

8-3 その他

・受賞歴

1. 受賞名：Travel award (優秀 abstract 賞)

学会名：3rd European Workshop on AMPK 年月：2017 年 9 月

・経歴

2014 年 04 月 リーディング大学院 生体統御ネットワーク医学教育プログラム 採用

2017 年 04 月 日本学術振興会特別研究員 (DC2) 採用