

- 14) Auewarakul, P., Wacharapornin, P., Srichatrapimuk, S., Chutipongtanate, S., & Puthavathana, P. (2005) *Virology*, 337, 93-101.
- 15) Ryo, A., Liou, Y.C., Lu, K.P., & Wulf, G. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 773-783.

三隅 将吾

(熊本大学大学院生命科学研究部・薬学生化学分野)

Biochemical analyses of HIV-1 uncoating process based on proteome analysis

Shogo Misumi (Department of Pharmaceutical Biochemistry, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan)

AMP キナーゼの新規基質 CLIP-170 の同定と微小管伸長スピード制御機構の解明

1. はじめに

AMPK (AMP-activated protein kinase) は現在最も関連する論文数が多いリン酸化酵素といっても過言ではない。ATP の加水分解産物である AMP を感知して活性化されるという AMPK の特異的な活性制御機構は、エネルギー代謝に重要であることは容易に推測される。それ故、糖尿病などの治療につながる創薬標的としても非常に注目を集めている。ところが AMPK には生化学的にいまだ多くの謎が残されている。確かに AMPK は生体外での反応系では AMP によって顕著に活性誘導されるが、実際に生体内でも AMP によって活性化されているのか、あるいは AMPK 自体のリン酸化酵素である LKB1 はどのように生体内で AMPK の活性化に関与しているかなど、重要な課題が未解決のままである。加えて近年おびただしい数の新規基質が同定されその数は増え続けている。それだけ多彩な基質を AMPK はどのように判別し、機能しているかなども不明のままである。ノックアウトマウスを使用した解析も散見されるがこのような多様な機能を持ったリン酸化酵素の解析には不向きであると思われる上にそもそも胎生致死となり解析そのものに難渋している。本稿では、もう一度 AMPK の生化学に立ち戻って基質とのカイネティクスに基づいてこの酵素の働きについて概説する。その中でも最近 *de novo* スクリーニングにより同定した新規の基質である CLIP-170 の非常にユニークな細胞生物学的側面につい

て併せ紹介する。

2. AMPK の活性制御機構

AMPK 自身の構造及び機能に関しては、すでに多くの総説が出版されているので詳しくはそれらを参照していただき¹⁾、本稿ではごく簡単にその特徴を述べる。AMPK のリン酸化酵素としての最も重要な働きは名前の通り AMP により活性化されるという性質である。生体外でリン酸化酵素と基質を反応させる単純な系において、AMP は殆どのリン酸化酵素の活性を抑制する。その中で、AMP により顕著に活性化される AMPK の特異性は実験開始当初は驚きであった。その独特の活性制御機構は当然結晶学者たちの注目も集め、酵母および哺乳類の AMPK の結晶構造が部分的ではあるが解かれた²⁾。これにより予想通り、AMPK にはリン酸基ドナーである ATP が結合する部位以外に AMP や ADP が ATP に比し比較的高い結合能で結合するであろう部位が複数存在した。

このことは AMPK に結合した AMP がアロステリックに AMPK の活性を上げることを示唆する。現在は AMP が結合することにより AMPK 自身がリン酸化されやすくなるのが活性化につながると考えられている³⁾。AMPK をリン酸化する上流のリン酸化酵素としては特に LKB1 が重要と考えられている⁴⁾。ただしそれでもまだ本当に細胞内でこういった活性制御が起こっているかは厳密には証明されていない。それは細胞内の AMP の濃度がいまだリアルタイムで正確に測定できないため、AMPK の活性と直接リンクしているかが証明できないからである。しかし AMPK が細胞に対するエネルギー枯渇を主とするストレスに対して活性化されるリン酸化酵素であることは間違いない。

3. AMPK のエネルギー代謝における役割

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⁵⁾。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。そうであれば増加した 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 が産生されるというこの分子機構は極めて合目的に思える。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⁶⁾、それぞれが AMPK によって活性化されることにより異化反応をすすめ同化反応を抑制する方向に向かう

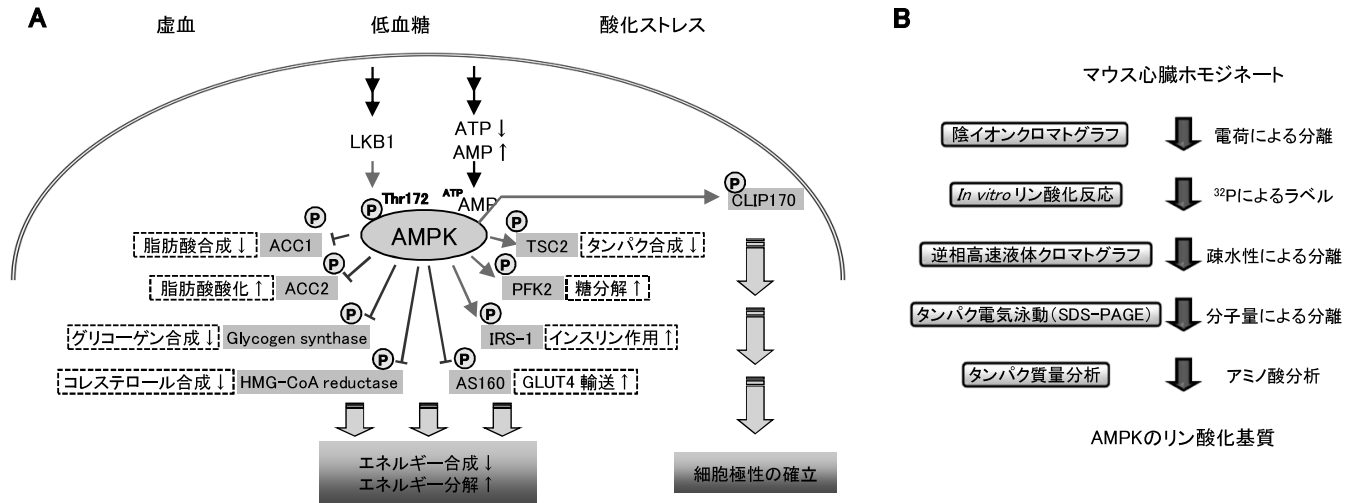


図 1

A, AMPK の活性化機構と基質群

AMPK は虚血, 低血糖, 酸化ストレスなどによりおそらく AMP の上昇を介して活性化されてさまざまな基質をリン酸化し機能を発揮する。

B, AMPK の新規基質の同定法 放射線ラベルされたリン酸基ドナーを利用した *de novo* スクリーニングを行った。

(図 1). ところがエネルギー代謝にかかわる解糖系をはじめとする酵素群にはほとんど厳密なフィードバック経路がすでに存在する。たとえば ACC は基質である acetyl-CoA のひとつ前のカスケードにあるクエン酸によって強力に活性増強され, またカスケードの最終産物である Fatty Acyl-CoA で活性抑制されるという実に巧妙でシンプルなフィードバック機構を持っている。それにも関わらずどうしてさらに AMPK によって活性を制御される必要があるのかは疑問である。これらのフィードバックシステムとのすみ分け等の解析はあまりされておらず, 他の基質についても同様の状況である。このような状況から古典的な生化学に立ち戻って AMPK の基質スクリーニングを新たに試みた。

4. AMPK の新規基質のスクリーニング

あるキナーゼの基質を同定する方法は, 直接結合をみる方法や, リン酸化部位特異的なコンセンサスシーケンスの存在でスクリーニングする方法, 最近では質量分析法などを用いた手法で大量のリン酸化部位を見つけてからアプローチする方法など様々な手法が用いられている。しかし, 最終的にその酵素が生体内で特定の基質を認識しリン酸化し, そのことが生理学的意義を持つかどうかを証明するのはかなりの検証が必要である。本稿で紹介する基質同定法は古典的ではあるが, ある程度酵素活性のキネティック

スを評価しながら基質を *de novo* でスクリーニングできる利点がある⁷⁾。

基質の精製材料として使用したのは ATP をもっとも大量に産生し, 低酸素などのストレスにさらされやすい心臓である。AMPK も比較的多く発現している。方法はまずマウスの心臓をホモジネートした後, いきなり非常に分解能の高い陰イオンカラムにかけ細かく分画する。次に, 自己リン酸化を防ぎ, さらに脱リン酸化を抑制しつつ各分画において *in vitro* のリン酸化反応を行う。高い分解能のカラムを使うことは組織に存在する大量の脱リン酸化酵素をフラクションアウトするために重要である。そしてこの *in vitro* のリン酸化反応により基質に取り込まれる放射線ラベルリン酸基の量は AMPK と基質との間の K_m , V_{max} そして基質そのものの量に依存する。次に放射線ラベルされた基質をもつフラクションをラベルしたまま逆相カラムなどの分解能の高いカラムにかけることにより, 最終産物の量と放射線ラベルの量を比較する (図 1B)。 *in vitro* リン酸化反応の時間を変化させることにより AMPK と K_m , V_{max} に差がある基質を区別することが可能となる。我々は, 生体内で実際にリン酸化されて機能している基質の同定のためにはある程度 K_m が低く V_{max} の大きい基質をスクリーニングする必要があると考えた。これは *in vitro* のリン酸化反応に伴う非特異的なリン酸取り込みによるアーチファクトを除くという意味もある。そのため, タンパク

質量は少ないものの AMPK によって大量のリン酸基を短時間に取り込む基質を標的にスクリーニングを進めた。その結果得られた新規の AMPK 基質が CLIP-170 である。実際に ACC と比べた K_m は二桁も CLIP-170 の方が低く AMPK に対するアフィニティは非常に高い。この手法は簡便であり酵素のキネティクスにあった解析ができるという意味でも生体内の真のリン酸化酵素基質を *de novo* でスクリーニングするには優れた手法と考える。是非試していただきたい。

5. AMPK の新規基質 CLIP-170

CLIP-170 は 1990 年に微小管結合タンパク質として同定された⁸⁾。しかし微小管の伸長していくプラス端の先端に

のみ結合するという重要な発見はそれから 9 年遅れて 1999 年に Perez らによってなされた⁹⁾。プラス端に結合してすぐに離れるというそのダイナミックな微小管との結合動態は微小管の動的制御や他の細胞骨格との相互作用を強く示唆し多くの報告がなされたが構造としての機能以外は明確にされていなかった^{10,11)}。

CLIP-170 が AMPK でリン酸化される意義を明確にするために、まず以下の三つの実験により *in vivo* で AMPK が CLIP-170 の S311 をリン酸化することを証明した。① *in vitro* で AMPK が直接 CLIP-170 をリン酸化した。② CLIP-170 の S311 の一か所がリン酸化された (図 2A)。③ S311 のリン酸化特異的の抗体を作成し、細胞において AMPK の阻害剤や siRNA によって CLIP-170 の S311 のリン酸化が

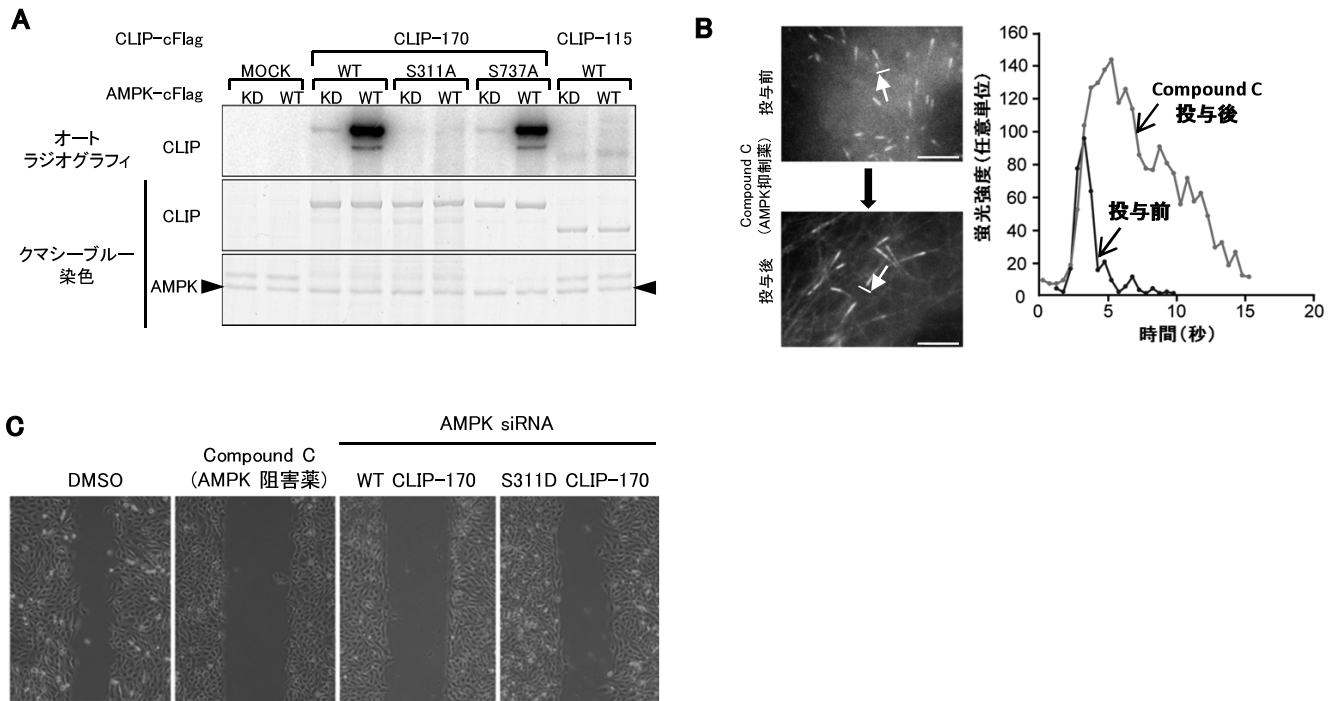


図 2 AMPK の新規基質 CLIP-170

A, AMPK は CLIP-170 の S311 をリン酸化する。

CLIP-cFlag および AMPK-cFlag をそれぞれリコンビナントタンパク質として合成し *in vitro* において放射線ラベルした ATP とリン酸化反応を行った。野生型の AMPK は CLIP-170 を特異的にリン酸化した。類似タンパク質である CLIP-115 はリン酸化されない。WT: 野生型 AMPK, KD: キナーゼ活性を失った AMPK

B, 非リン酸化された CLIP-170 は微小管からの解離スピードが減少する。

Vero 細胞に安定発現させた GFP-CLIP-170 をライブイメージングしキネティクスを観察した。GFP-CLIP-170 は微小管伸長に一致して高速で細胞内を移動している。その途中で 1 ピクセル分のラインを引き (左図), そこを通過する GFP-CLIP-170 の量を計測した (右図)。Compound C (AMPK 阻害剤) を加えることにより, 非リン酸化された CLIP-170 (Compound C 投与前) はリン酸化 CLIP-170 (Compound C 投与後) に比し微小管に対する結合速度は同等であるが解離速度が遅いことが示された。

C, AMP-CLIP-170 シグナルの阻害により細胞遊走が阻害される。

Vero 細胞を使用したスクラッチアッセイ。Compound C の投与, あるいは S311A CLIP-170 un-phosphorylated mutant を導入すると細胞遊走が阻害される。また AMPK の阻害により鈍化した細胞遊走が S311D CLIP-170 phospho-mimic mutant の導入により rescue される。

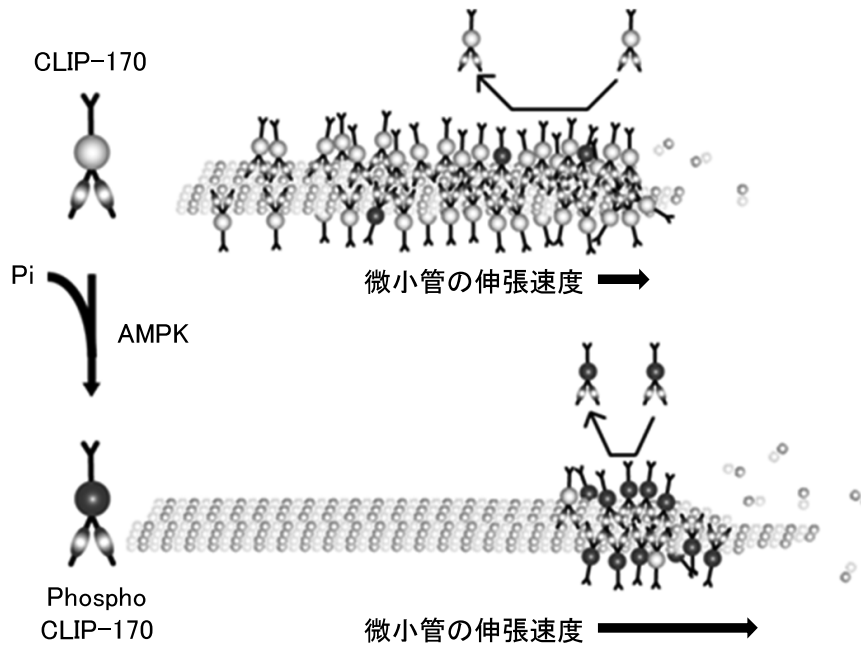


図3 AMPK, CLIP-170 シグナルによる微小管伸長スピード調整作用
AMPKによりリン酸化されたCLIP-170は結合したtubulinを微小管先端に連れてきてすぐに離れていくため重合されるtubulinの効率が高くなり伸長速度が増加する。

抑制されることを証明した。

次にリン酸化CLIP-170の局在を調べたところ、CLIP-170は微小管の先端に位置するが、リン酸化されたCLIP-170はさらにその先端に結合することが示された。微小管の先端はまだ加水分解されていないGTP-tubulinが結合しておりCLIP-170は選択的にこのGTP-tubulinと結合すると考えられている。リン酸化されたCLIP-170はGTP-tubulinとの結合が弱く、よりGTP-tubulinの多い最も先端に結合することが示された。実際にGFP-CLIP-170を使用してライブイメージで撮影して微小管の一点でのCLIP-170の結合動態を解析すると図2Bに示すように脱リン酸化されたCLIP-170は微小管からの解離速度が顕著に低下することが示された。

非常に衝撃的だったのは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極端にCLIP-170の動き、すなわち微小管の伸長スピードが遅くなったことである。これまで他の研究者によりCLIP-170の発現抑制実験などは数多く行われていたが微小管のスピード変化が報告されたことはなかった。つまりCLIP-170は微小管先端に存在して初めてAMPKによるリン酸化により微小管のスピード制御を行えることが明らかになった。微小管の動きを動的に制御するリン酸化酵素とし

てはこのAMPKが初めてであり、意外な発見であった。この分子メカニズムは現在解析中であるが、おそらくCLIP-170はtubulinと結合して微小管の先端に連れてくるポリメラーゼのような作用を有しており、伸長が効率よく行われるには運んできたtubulinが重合されると素早く離れる必要があると思われる。AMPKはこのCLIP-170の解離スピードを調整することにより微小管スピードを制御することができると考えている(図3)。実際にはここにEB1などの他の微小管先端に結合するタンパク質の存在が欠かせないと考えられるが、AMPKによる調節はおおむねこの仮説が正しいのではないかとと思われる。最近は分子イメージング系が発達して、*in vitro*の再構成系を使って微小管の伸長を観察できるようになっている¹²⁾。現在これらの系を利用してCLIP-170の微小管スピード調節機構をさらに詳しく解析している。

6. AMPKによるCLIP-170のリン酸化と細胞極性

それではAMPKはCLIP-170のリン酸化により微小管の伸長スピードを上げることにより細胞内でなにをしているのであろうか。微小管は細胞膜周辺で非常に速い、伸長と退縮を繰り返している。遊走している培養細胞では特にこの活発な微小管の動きが観察される。これは微小管が適切

に分泌小胞等を移送させるためのレールとして伸長・退縮して刻々と界面が変わる細胞膜を捕まえるため必要なメカニズムであると考えられる。細胞がストレスにさらされたときには特に微小管の動きを活性化させて、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。そういった作用に AMPK は働いているのではないかと考えている。事実、AMPK の活性を抑制すると運動の激しい細胞では微小管の伸長スピードが低下し、過度の微小管の安定化がみられる。それと同時に細胞は前後の極性を失い、スクラッチアッセイおよび自由運動における細胞遊走は著しく阻害される (図 2C)。これは CLIP-170 の AMPK リン酸化部位である S311 をアラニンに置換させた S311A mutant 導入細胞においても顕著に観察された。以上のことは AMPK-CLIP-170 シグナルが細胞極性にも微小管の伸長制御を介して深く関与していることを示唆する。

実は哺乳類より下等動物にも AMPK およびその上流の LKB1 のオルソログが存在する。しかしこれらの酵素がエネルギー代謝に関与しているという報告はなく、極性に関与しているとされている^{2,13,14}。哺乳類においても AMPK は細胞極性に関与しているとの報告がある¹⁵。これらの作用はおそらく CLIP-170 がその基質として関与していると考えられる。今後極性形成と AMPK-CLIP170 シグナルに関する解析が進展すると期待される。

7. おわりに

最後に、それでは図 1 に示したたくさんの基質を AMPK はいかに使い分けているのであろうか。この問いに答えるすべは現在ないが、精製同定の経緯からも、CLIP-170 はこの中でも最も低い活性の AMPK によってリン酸化される基質であると考えられる。そして細胞内のごく基本的な恒常性維持に微小管の構造構築の維持という形で関与している。他の基質はおそらくエネルギー枯渇が進んで AMPK がかなり活性化した時点でリン酸化されその独自の作用を発揮すると予想している。ただ AMPK の阻害剤や AMPK のノックアウトマウスの解析を行う際には微小管の機能障害という決定的な細胞障害がおこることを予測して表現型の解析を行う必要があるだろう。

AMPK に限らず、リン酸化酵素の生体内での解析は単純な阻害実験では解決しにくい課題も多い。しかしその機能の阻害や活性化はさまざまな疾患の治療にも応用されつつあり正確にその内因性の基質を同定し機能解析すること

はますます重要になっていくと考える。そういった研究にこの総説が少しでも役に立てばと願ってやまない。

最後にこの実験を主に行った中野敦博士、支援ご指導いただいた北風政史博士に深く感謝いたします。

- 1) Hardie, D.G. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 774-785.
- 2) Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.H., Shong, M., Kim, J.M., Kim, J., & Chung, J. (2007) *Nature*, 447, 1017-1020.
- 3) Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., & Carling, D. (2000) *Biochem. J.*, 345 Pt. 3, 437-443.
- 4) Carling, D., Sanders, M.J., & Woods, A. (2008) *Int. J. Obes. (Lond.)*, 32 Suppl. 4, S55-59.
- 5) Carling, D., Zammit, V.A., & Hardie, D.G. (1987) *FEBS Lett.*, 223, 217-222.
- 6) Carling, D. (2004) *Trends Biochem. Sci.*, 29, 18-24.
- 7) 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) *Nat. Cell Biol.*, 12, 583-590.
- 8) Rickard, J.E. & Kreis, T.E. (1990) *J. Cell Biol.*, 110, 1623-1633.
- 9) Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., & Kreis, T.E. (1999) *Cell*, 96, 517-527.
- 10) Akhmanova, A. & Hoogenraad, C.C. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 47-54.
- 11) Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., & Kaibuchi, K. (2002) *Cell*, 109, 873-885.
- 12) Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., & Surrey, T. (2007) *Nature*, 450, 1100-1105.
- 13) Martin, S.G. & St Johnston, D. (2003) *Nature*, 421, 379-384.
- 14) Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., & Kemphues, K.J. (2000) *Development*, 127, 1467-1475.
- 15) Zhang, L., Li, J., Young, L.H., & Caplan, M.J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 17272-17277.

高島 成二

(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学
分子心血管医学)

AMP-kinase regulates the speed of microtubule polymerization and cell polarity by phosphorylation of microtubule plus end protein CLIP-170

Seiji Takashima (Department of Cardiovascular Medicine, Department of Molecular Cardiology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)