

論文内容の要旨

論文題目 AMPK 関連酵素 SNARK の生理機能解析

氏名 空閑 亘

序論

AMPK (AMP-activated protein kinase) はエネルギーが不足した際に活性化する代謝調節因子である。AMPK が活性化すると ATP 消費経路 (脂肪酸合成やコレステロール合成) が抑制されると同時に ATP 合成経路 (脂肪酸酸化や糖分解) が促進されることでエネルギー不足に対応する。SNARK (SNF1/AMPK-related kinase, also known as NUAK2) は触媒ドメインの相同性から AMPK 関連酵素と考えられている。SNARK は AMPK と同様に栄養不足になると活性化する。一方で SNARK は紫外線によっても活性化する。これより SNARK は代謝調節だけでなく、DNA 損傷を含めたストレス応答機構に関与すると考えられる。当研究室で作製した *Snark* ノックアウトマウスが野生型に比べ肥満の兆候を示し、また大腸の化学発癌実験では野生型に比べ前がん病変が多く検出されるなど個体レベルでの SNARK が関与する生理機能は明らかになりつつある。その一方、細胞レベルでの SNARK の生理機能はほとんど解明されていない。本研究は SNARK が細胞内でどのような生理機能を有しているかを解明することを目的としている。それにはまず SNARK の細胞内局在を明らかにし、活性化刺激に応じて局在の変化が生じるかを観察することは SNARK の細胞内での機能を解明するに当たり有益であると考えた。本研究では SNARK が従来の AMPK と異なり核に存在し、核内で転写調節に関与する可能性を発見した。さらに紫外線照射に応じて SNARK は顆粒体を形成し、ATR や p53 と共局在することがわかった。

結果

1. SNARK は核に局在する

SNARK の細胞内局在を同定するために、ヒト肝がん細胞株 PLC/PRF/5 およびヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に SNARK の N 末端に FLAG エピトープタグを融合した FLAG-SNARK を過剰発現させた。抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法で染色し、共焦点顕微鏡で FLAG-SNARK の細胞内局在を観察した。その結果、FLAG-SNARK は核に局在した (Fig. 1a)。また細胞分画を行い、核画分ならびに細胞質画分の SNARK を抗 SNARK 抗体で検出した。その結果、内在性の SNARK も核画分にほとんどが検出された (Fig. 1b)。これより SNARK は核に局在することがわかった。さらに SNARK を活性化する刺激を加えても SNARK は核に局在していた。

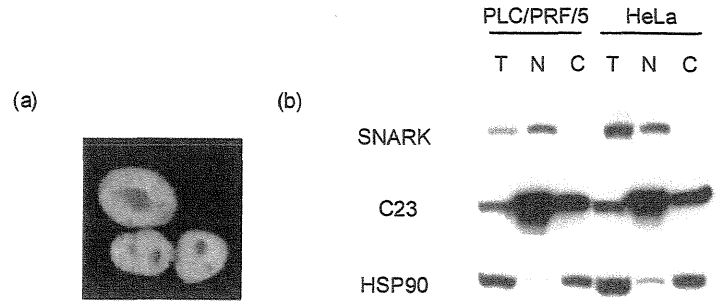


Fig. 1 SNARK核に局在する (a)PLC/PRF/5細胞にFLAG-SNARKを過剰発現させて、抗FLAG抗体を用いた間接抗体染色により局在を確認した(倍率はx630)。(b)PLC/PRF/5細胞ならびにHeLa細胞に対し細胞分画を行った。C23、HSP90はそれぞれ核タンパク、細胞質タンパクのマーカースとして使った。またT,N,Cはそれぞれ総タンパク、核画分、細胞質画分を表す。

2. SNARK は核内で転写調節に関わる

活性化した SNARK も核内に局在するので、SNARK は核内で機能すると考えた。そこで SNARK の核内での機能を調べるために核局在しない SNARK 変異体発現ベクターを作製した (Fig. 2)。アミノ酸一次構造解析から SNARK には monopartite 型核移行シグナルのパターン配列 K-(K/R)-X-(K/R) に合う配列が 3ヶ所見つけた。SNARK の部分欠損変異体を用いて核移行シグナルの候補を選別した結果、⁶⁸KKAR⁷¹ が SNARK の核移行シグナルとして機能することがわかった。この ⁶⁸KKAR⁷¹ のリジンをアラニンに換えた核移行シグナル変異体 ⁶⁸AAAR⁷¹ あるいは野生型の SNARK を過剰発現させた PLC/PRF/5 細胞において遺伝子発現に差が見られるか調べた。マイクロアレイによる解析を行ったところ、SNARK の野生型で 1.5 倍以上の転写量変化が生じたものは 945 個あったが、そのうち ⁶⁸AAAR⁷¹ でも 1.5 倍以上変化したものは 254 個だけであった。これより SNARK は核内で遺伝子発現の調節に関わることが示唆された。

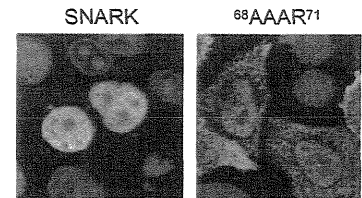


Fig. 2 ⁶⁸KKAR⁷¹はSNARKの核移行シグナルであるFLAG-SNARKおよび⁶⁸AAAR⁷¹をPLC/PRF/5細胞に過剰発現させ、抗FLAG抗体を用いた間接抗体染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した

3. 紫外線により SNARK は核内で顆粒体を形成する

SNARK が核内で遺伝子発現の調節を行う可能性があるため、転写因子との相互作用を考えた。転写因子は刺激に応じて特定の核内ドメインに集積する。SNARK を活性化する刺激に応じて、SNARK の核内局在が変化するか調べた。FLAG-SNARK を安定発現している PLC/PRF/5 細胞に AMPK 活性化剤 AICAR、グルコース欠乏、紫外線などの刺激を加え、1 時間後の SNARK の局在を観察した。AICAR やグルコース欠乏などの代謝ストレスでは SNARK の局在変化は観察されなかった。しかし紫外線を照射した細胞では SNARK が核内で顆粒体を多く形成した。経時的観察から興味深い SNARK の核内分布変化が観察された。SNARK の顆粒体形成は紫外線照射後 1 時間から始まり 3 時間後に最も多くなった。そして紫外線照射後 8 時間経つ

と SNARK は照射前と同じように核内に拡散した (Fig. 3)。

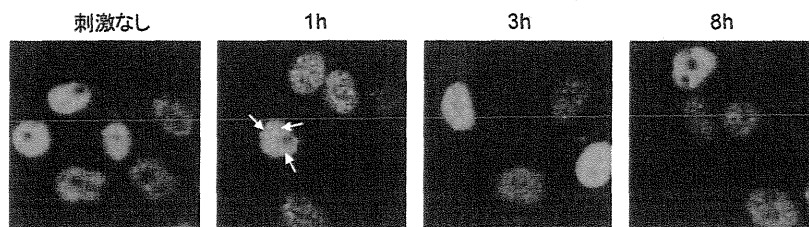


Fig. 3 SNARKは紫外線に応じて顆粒体を形成する FLAG-SNARKを安定発現しているPLC/PRF/5細胞にUV-C (20J/m²) を照射し、SNARKの局在の経時的変化を観察した。白い矢印はSNARKの顆粒体を示す。

4. SNARK は p53 と共局在する

紫外線による刺激を受けたSNARKは顆粒体を形成するので、この顆粒体がどこに集積しているかを調べた。紫外線照射に応じて働く転写因子として p53 が知られている。FLAG-SNARK を安定発現する PLC/PRF/5 細胞に紫外線照射後、SNARK と p53 の核内での局在を調べた。その結果、SNARK はセリン 15 番目がリン酸化した p53 と共局在を示した (Fig. 4)。また SNARK は ATR とも共局在したことから、SNARK は紫外線により活性化する ATR-p53 経路と相互作用する可能性が考えられた。

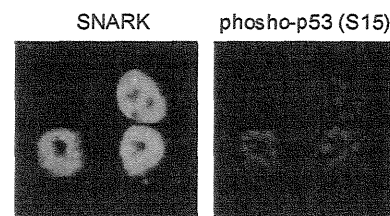


Fig. 4 SNARKはp53と共局在する FLAG-SNARKを安定発現するPLC/PRF/5細胞にUV-C (20J/m²) を照射、1時間後のSNARKならびにセリン15番がリン酸化したp53の局在を観察した。

5. SNARK は p53 の転写活性化能を増強する

SNARK が p53 の転写活性化能に影響するかを調べるために、野生型の p53 を発現するヒト乳がん細胞株 MCF-7 に SNARK を過剰発現し、p53 の転写活性に変化が生じるかを確認した。SNARK を過剰発現させた細胞では、コントロールの GFP を過剰発現させた細胞に比べ、p53 の転写活性が約3倍増加した (Fig. 5)。これより SNARK は p53 の転写活性化能を増加する可能性が示唆された。また SNARK が p53 と結合するか確認したところ、結合は確認されなかった。よって SNARK は間接的に p53 の転写活性化能を増強すると推測された。

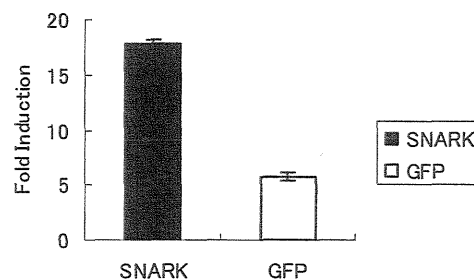


Fig. 5 SNARKを過剰発現するとp53の転写活性が増加する MCF-7細胞にp53標的のプロモーターを持つレポーターベクターと共にSNARKあるいはGFPを導入し、p53の転写活性を調べた。GFPはネガティブコントロールとして使用した。

6. SNARK は紫外線による細胞死を促進する

ATR-p53 経路は紫外線照射後の細胞の生死を司る働きがある。もし SNARK が p53 の転写活性化能を高めるならば、紫外線照射に応じて SNARK が細胞死を促進すると考えられた。そこで *Snark* ホモノックアウトマウスの胚性線維芽細胞に紫外線を照射し、12 時間後の細胞死の割合を調べた。*Snark* ホモノックアウト

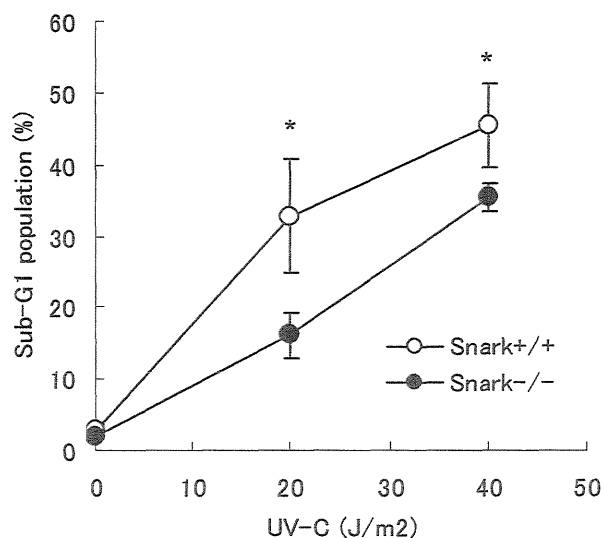


Fig. 6 *Snark*ノックアウトマウスの胚性線維芽細胞は紫外線による細胞死に抵抗性を示す *Snark*ノックアウトマウスならびに野生型マウスの胚性線維芽細胞にUV-Cを照射、12時間後のsub-G1の割合をFACSで解析した (*, P<0.05)。Snark^{+/+}、Snark^{-/-}はそれぞれ野生型、*Snark*ホモノックアウトマウスを表す。

マウスの胚性線維芽細胞は野生型に比べ、紫外線による細胞死が生じにくくなった (Fig. 6)。また PLC/PRF/5 細胞に SNARK を過剰発現すると紫外線による DNA 損傷の修復が遅くなった。よって SNARK は紫外線照射後の細胞を DNA 修復に向かわせるのではなく、細胞死に向かわせる働きがあることが示された。

結論

本研究の結果は次のようにまとめられる。

1. SNARK は核に局在する AMPK 関連酵素である

SNARK は核に局在するため、SNARK の調節機構ならびに標的分子は核内に存在すると考えられる。

2. SNARK の核移行シグナルは ⁶⁸KKAR⁷¹ である

SNARK の部分欠損変異体および点変異体の局在から、SNARK は N 末端側に存在する ⁶⁸KKAR⁷¹ を核移行シグナルとして核に局在することがわかった。

3. SNARK は核内で転写調節に関わる可能性がある

SNARK の野生型と核移行変異体の転写制御への影響を比較した結果、SNARK は核内で転写の調節に関わる可能性が示唆された。また当研究室の *Snark* ノックアウトマウスの解析では、SNARK が脂質代謝に関わる遺伝子群の転写制御に影響することがわかった。

4. SNARK は紫外線により核内で顆粒体を形成し、p53 と共局在する

SNARK は紫外線照射に応じて核内で顆粒体を形成する。この顆粒体は p53 と共局在した。p53 を始め多くの転写因子は核内の特定ドメインに集積して転写制御を行うので、SNARK もまた核内で集積し、転写調節に影響を与えていると考えられる。SNARK は p53 と直接結合はしないが、p53 の転写活性化能を増強するため、p53 を間接的に制御していると期待される。

5. SNARK は紫外線照射による細胞死を誘導する

Snark ノックアウトマウスの胚性線維芽細胞では紫外線による細胞死に耐性が見られた。また当研究室の *Snark* ノックアウトマウスの解析では、化学発癌実験を行うと *Snark* ノックアウトマウスでは野生型に比べ大腸で前がん病変が多発した。これらの知見は SNARK が欠損していると細胞に DNA の変異が蓄積しても細胞死を誘導できないためにがん化してしまう可能性を示唆している。

以上より SNARK は核内で代謝ストレスや DNA 損傷ストレスへ応答する分子機構に関与すると考えられる。SNARK は細胞内で p53 が介するストレス応答機構に関与し、転写調節を介して DNA が損傷した細胞を細胞死に誘導することで細胞のがん化を防いでいる可能性が考えられる。

発表論文

[1] K. Tsuchihara, T. Ogura, R. Fujioka, S. Fujii, W. Kuga, M. Saito, T. Ochiya, A. Ochiai, and H. Esumi, Susceptibility of *Snark*-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci, *Cancer Sci* (2008).

[2] W. Kuga, K. Tsuchihara, T. Ogura, S. Kanehara, M. Siato, A. Suzuki, H. Esumi, Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression, *Biochem Biophys Res Commun* (2008).