

AMPK 関連酵素 SNARK の生理機能解析及び核移行シグナル配列の同定

2006 年 3 月修了

先端生命科学専攻

がん先端生命科学分野

学生証番号 46527

空閑 亘

指導教官 江角浩安教授

キーワード

AMPK、SNARK、核移行シグナル、紫外線応答

(背景・目的)

SNARK (SNF1/AMPK-related kinase) は代謝調節因子 AMPK の触媒サブユニットファミリーのうち 4 番目に見つかったキナーゼである。SNARK もまた他の AMPK ファミリーと同様に AMPK 活性化剤 AICAR (5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside) の刺激やグルコース欠乏時に活性が上昇することが知られている。SNARK はこの他、グルタミン欠乏、高浸透圧ストレス、酸化ストレスなどによっても活性化されることから細胞内ストレス応答に関与していると考えられている。しかしながら SNARK の調節機構及び標的となる基質分子についてはほとんど解明されていない。SNARK の細胞内局在を明らかにし、種々の刺激による局在の変化を観察することは SNARK に相互作用する分子の同定、生理的機能の解明に当たって有益である。本研究では SNARK が従来の AMPK とは異なり、定常状態で核に局在することを明らかにし、SNARK の核移行を制御する NLS (Nuclear Localization Signal) を同定した。さらに SNARK の核内局在が紫外線照射に応じて変化することを発見した。

(結果)

1. SNARK の細胞内局在

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa に SNARK の N 末端に FLAG エピトープタグを融合したヒト SNARK を強制発現させた。抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法で染色し、共焦点顕微鏡で融合タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、SNARK は定常状態で主に核に局在した (Fig.1)。核内に存在する SNARK は核小体以外の核全体に拡散し存在した。

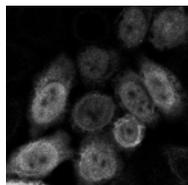


Fig.1 SNARK の細胞内局在

2. SNARK-NLS の同定

SNARK の核内局在の機構を解明するために SNARK の NLS を特定することを試みた。アミノ酸一次構造解析から monopartite 型 NLS パターン K(K/R)X(K/R) に合う配列が 3 ケ所見つかった。

SNARKの部分欠損変異体を用いて⁶⁸KKAR⁷¹を含むSNARKタンパク質が核移行することを特定した。⁶⁸KKAR⁷¹がSNARKのNLSであることを確かめるためにリジンをアラニンに換えたNLS点変異体SNARK-⁶⁸AAAR⁷¹をHeLa細胞に一過性に発現させて細胞内局在を調べた。SNARK-⁶⁸AAAR⁷¹は野生型と異なり細胞質に優位に存在した(Fig.2)。安定発現系でも同様の細胞内局在が観察された。

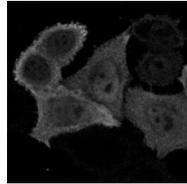


Fig.2 SNARK-⁶⁸KKAR⁷¹の細胞内局在

3. UVによるSNARKの核内局在の変化

SNARKは紫外線照射した細胞中でキナーゼ活性が上昇すると報告されているので、紫外線刺激がSNARKの局在に及ぼす影響を調べた。3xFLAG融合SNARKを安定発現する肝がん細胞PLC/PRF/5に20mJの紫外線を照射し、30分、1、2、4時間後にSNARKの局在に変化があるかを観察した(Fig.3)。刺激前の場合SNARKは核小体以外の核内に拡散して分布したのに対し、紫外線照射した場合には核内で顆粒体を多く形成した。また経時的観察から興味深い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30分から始まり2時間後に最も多くなった。そして紫外線照射後4時間経つとSNARKは照射前と同じように核内に拡散した。

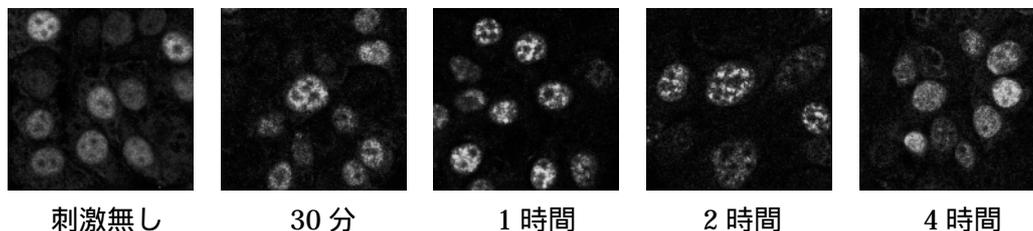


Fig.3 紫外線照射によるSNARKの核内局在の経時変化

(考察)

本研究の結果は次に3点にまとめられる。

1. SNARKは核に局在するAMPK関連キナーゼである
一過性および安定発現させたSNARKは定常状態で核に優位に存在した。これよりSNARKの基質は核内にあると考えられる。
2. SNARKのNLSは⁶⁸KKAR⁷¹に存在する
アミノ酸一次構造から3ヶ所のmonopartite型NLSモチーフが予測された。部分欠損変異体、点変異体、EGFP融合タンパク質を用いた実験から、これらのうちN末端側に存在する⁶⁸KKAR⁷¹がNLSとして機能することが示された。
3. 紫外線照射によりSNARKの核内局在は変化する
SNARK活性化刺激である紫外線照射によりSNARKが核内で顆粒状になることが明らかになった。これはSNARKがストレスにตอบสนองして核内で機能することを示唆している。