

# AMPK関連酵素SNARKの生理 機能解析及び核移行シグナル の同定

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻修士課程

がん先端生命科学分野  
学生証番号46527  
空閑 亘

## 目次

概要	1
序論	3
実験方法ならびに実験材料	7
結果	14
考察	20
謝辞	25
図表	27
参考文献	41

## 概要

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た。次にSNARKの核移行の機構を解明するためにSNARKのNLS (Nuclear Localization Signal) 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ヶ所見つかかり、そのうちのN末端近傍の<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>によりSNARKの核移行が制御されていることを示した。さらに紫外線がSNARKを活性化することからSNARKを安定発現する肝がん細胞PLC/PRF/5に紫外線を照射したところ、定常状態では核内に拡散しているSNARKが核内で顆粒状に凝集することが明らかになった。以上からSNARKは核内に基質を持ち、紫外線によって引き起こされ

る生理機能に関与していると考えられた。

## 序論

AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) は長鎖脂肪酸合成の重要な酵素である acetyl-CoA-carboxylase やコレステロール合成の重要な酵素である HMG-CoA reductase を阻害するキナーゼとして単離、同定された。その後の構造解析の結果出芽酵母キナーゼである SNF1 (sucrose-non-fermenting protein kinase) の哺乳類ホモログと考えられるに至った[1]。SNF1 は炭素源をグルコースからショ糖に切り替えた培地では増殖不能となった出芽酵母変異体から単離された。SNF1 はグルコース抑制遺伝子群の転写を介したエネルギー制御、芽胞形成、温度耐性やペルオキシソームの生合成に必要とされる[2]。SNF1 と同様に哺乳類の AMPK も細胞内でエネルギーバランスを制御していることが注目されている[3, 4]。AMPK は細胞内の ATP の減少とそれに伴う AMP の増加により細胞内の AMP : ATP の比率が AMP に傾く、つまりエネルギーが不足になると活性化される[5]。活性化された AMPK は下流因子をリン酸化し、一方で ATP 消費系 (脂肪酸合成やコレステロール合成) を抑制し、他方で ATP 合成系 (脂肪酸酸化や糖分解) を促進することでエネルギー不足に対応していると考えられている[6]。また高温、高浸透圧、低酸素、酸化ストレスなどの刺激に応答して活性化することも知られている[7-9]。さらに全身の栄養状態を反映するアディポサイトカイン (レプチン、アディポネクチン) や自律神経系による AMPK の活性化、抑制化機構も明らかにされ、AMPK がより高次の代謝調節機構に関与していること

が示唆された[10-12]。AMPK は触媒サブユニットの $\alpha$ サブユニット、制御サブユニットの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの3つのサブユニットを持つことが良く知られており、これらがヘテロ3量体を形成するとキナーゼ活性を示す[13]。それぞれのサブユニットにはアイソタイプがあり、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットには2つ、 $\gamma$ サブユニットには3つある。AMPK は AMP によるアロステリックな調節に加え、 $\alpha$ サブユニットのスレオニン残基のリン酸化によっても活性が調節される[14]。スレオニン残基をリン酸化するキナーゼとして LKB1、CaMKK  $\alpha$ 、 $\beta$ が同定され、これらは AMPK の上流キナーゼとして考えられている[15-17]。キナーゼの活性中心のアミノ酸配列の相同性から AMPK ファミリー遺伝子はヒトで 14 個あると予測されている[18]。これらのうち AMPK- $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、MELK、SNARK、ARK5 については実際にキナーゼ活性が確認されている[19-21]。

SNARK (SNF1/AMPK-related kinase) はセリン/スレオニンキナーゼである AMPK 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[20]。SNARK は元々ラットケラチノサイトで紫外線 (UV-B) 照射により誘導される遺伝子として単離された。ラットにおいて SNARK は腎臓や脾臓、肺など広範に発現していた。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る[22]。肝がん細胞 HepG2 で

SNARK を過剰発現させると、グルコース飢餓時に PKC、FAK のリン酸化抑制を伴い細胞間乖離を誘導することが報告された[23]。また SNARK をヒト腎臓がん細胞 ACHN に過剰発現させると Fas 刺激によるアポトーシス抵抗性が増加し、siRNA で SNARK を抑制するとアポトーシス感受性が増加することも報告された[24]。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。我々は SNARK の機能を明らかにするための第一歩として SNARK の細胞内局在を調べた。その結果、SNARK は従来の AMPK とは異なり定常状態で核に局在することがわかった。

一般に核内タンパク質は小胞体上のリボソームで合成された後、核内輸送タンパク質を介して核内に輸送される。その機構は次の通りである[25]。核内輸送受容体である Importin  $\beta$  が核輸送アダプタータンパク質である Importin  $\alpha$  とヘテロ 2 量体を形成すると、Importin  $\alpha$  の輸送対象である積み荷タンパク質への親和性が高まる。Importin  $\alpha$  は積み荷タンパク質の核移行シグナル (NLS : Nuclear Localization Signal) を認識し、積み荷タンパク質/Importin  $\alpha$  /Importin  $\beta$  のヘテロ 3 量体を形成する。Importin  $\beta$  が核膜孔複合体 (NPC) に結合、続いて複合体全体が核内に取り込まれる。核内では Ran-GTP が Importin  $\beta$  と結合することで複合体が解離し、積み荷タンパク質が核内に局在することになる。Importin  $\alpha$  が結合する NLS には SV40T 抗原に代表される一塊の塩基性アミノ酸から成る

monopartite型NLS、ヌクレオプラスミンに代表される2つの塩基性アミノ酸クラスターから成るbipartite型NLSが知られている。現在monopartite型NLSはK(K/R)X(K/R)、bipartite型NLSはKRX<sub>10-12</sub>KRRKという共通配列を取ることが報告されている[26, 27]。

本研究はSNARKは定常状態で核に局在することを明らかにし、SNARKの核局在を制御するNLS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。



## 実験方法ならびに実験材料

### プラスミド構築

N末端にエピトープタグFLAGを融合したヒトSNARK発現ベクターpcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKは当研究室で作製されたものを用いた[23]。このプラスミドはヒト精巢のcDNAを鋳型にSNARKのORFをPCRで増幅し、pcDNA3.1(+)(Invitrogen)に組み込んである。SNARKの部分欠損変異体発現ベクターであるpFLAG-SNARK-(2-447),-(2-370),-(2-169),-(78-447),-(311-628)および(390-628)は以下のよう  
に作製した。それぞれヒトSNARKのアミノ酸残基2~447、2~370、2~169、78~447、311~628、390~628に相当する部分をコードするcDNA断片をpcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKを鋳型とし、Table.1に示すプライマーを用いLA PCR (Takara Biomedicals,Japan)で増幅した。PCRは95℃2分、94℃30秒/55℃1分/72℃2分を25サイクル、72℃10分の条件で行った。得られたPCR産物をEcoR I及びXho Iで制限酵素処理し、pcDNA3.1(-)(Invitrogen)に組み込んだ。SNARKのN末端を融合したEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)が発現するベクターpGFP-(1-169)は以下のように作製した。ヒトSNARKのアミノ酸残基1~169に相当する部分をコードするcDNA断片をpcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKを鋳型とし、Table.1に示すプライマーを用いKOD Plus PCR (TOYOBO)で増幅した。PCRは95℃2分、94℃15秒/60℃30秒/68℃1分を25サイク

ル、72°C 10 分の条件で行った。得られたPCR産物をSac II 及びNhe I で制限酵素処理し、EGFP発現ベクターpQBI25 (MP Biomedicals,Irvine,CA) のEGFP遺伝子の 5'側にインフレームで組み込んだ。野生型SNARKのN末端に 3xFLAGタグが融合したタンパク質を発現するベクター p3xFLAG-SNARKは以下のように作製した。ヒトSNARKのORFをpcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKを鋳型とし、Table.1 に示すプライマーを用いKOD Plus PCRで増幅した。PCRは 95°C2分、94°C1分/55°C30秒/68°C2分を 25 サイクル、72°C10分の条件で行った。得られたPCR産物をEcoR I 及びXba I で制限酵素処理し、p3xFLAG-CMV (Sigma) に組み込んだ。点変異体発現ベクターであるp3xFLAG-SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>の作製方法をFig.1 に示す。目的とするアミノ酸置換に相当する塩基配列を含むプライマーSNK-KKAR-F2 およびSNK-KKAR-R2 を設計した。F2 は置換部位以外の配列をSNARKのcDNAの 5'→3'鎖と相同に、R2 は 3'→5'と相同にした。第1段階としてSNARKの 5'末端に相同なプライマー3xF-EcoR I とSNK-KKAR-R2、SNK-KKAR-F2 とSNARKの 3'末端に相同なプライマー3xF-Xba I を用い、pcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKを鋳型にPCR (95°C2分、94°C1分/55°C30秒/68°C2分を25 サイクル、72°C10分) を行った(Fig.1 PCR ①)。これにより合成された変異を含む2種類のPCR産物を混合、熱変性し、DNA配列が重なり合う部分を利用してアニーリングさせPCR(95°C2分、94°C30秒/55°C30秒/68°C2分を25 サイクル、72°C10分)を行った(Fig.1. PCR ②)。得られたPCR産物を鋳型として3xF-EcoR I、3xF-Xba I を用いPCR(95°C2分、

94°C30 秒/55°C30 秒/68°C2 分を 25 サイクル、72°C10 分) を行った(Fig.1 ③)。得られたPCR産物をEcoR I、Xba I で制限酵素処理し、p3xFLAG-CMVベクターに組み込み、変異導入部位を含めた全配列を確認した。p3xFLAG-SNARK-450AAPR<sup>453</sup>はpcDNA3.1(+)-FLAG-SNARKを鋳型にTable.1 に示す変異を含んだプライマーSNK-KKPR-R2、SNK-KKPR-F2 を用い上記と同様に作製した。p3xFLAG-SNARK-(<sup>68</sup>AAAR<sup>71-450</sup>AAPR<sup>453</sup>)はp3xFLAG-SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>を鋳型にしてp3xFLAG-SNARK-450AAPR<sup>453</sup>と同様のプライマー、方法で作製した。使用したプライマーをTable.1 に示した。また全ての発現ベクターは反応試薬にBigDye Terminator Cycle Sequencing,FS (Applied Biosystems)、解析に 3100 Sequencing Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を確認した。

## 細胞培養

培養細胞は当研究室に保有されているものを用いた。ヒト肝がん細胞PLC/PRF/5ならびにヒト子宮頸がん細胞HeLaは 10%ウシ胎児血清入りのD-MEM培地 (GIBCO) で 37°C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内にて培養した。細胞に紫外線照射する実験ではGS GENE LINKER (BIO-RAD) を用いた。フェノールレッドを含むD-MEM培地中の細胞にUV-Cを 20mJ照射した。その後速やかに 37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内に戻し 30 分、1、2、4 時間培養後に細胞を固定した。栄養飢餓刺激を与える実験ではアミノ酸、グルコース欠如

培地であるNDM培地( $0.25 \mu\text{M Fe(NO}_3\text{)}$ 、 $5.4 \mu\text{M KCl}$ 、 $0.81 \mu\text{M MgSO}_4$ 、 $110 \mu\text{M NaCl}$ 、 $0.90 \mu\text{M NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $1.8 \mu\text{M CaCl}_2$ 、 $44 \mu\text{M NaHCO}_3$ 、 $25\text{mM HEPES pH}7.4$ 、 $100\times$  Vitamin solution (GIBCO)、Phenol red)を用いた[28]。通常培地で1日培養した後PBSで2回洗い、NDMを加えて2時間、24時間培養した。その後細胞を固定した。

## 抗体

抗 FLAG M2 抗体 (F4049,Sigma)、抗 GFP(FL) 抗体 (sc8334,Santa Cruz Biotechnology,Inc)、抗 PML 抗体 (sc5621,Santa Cruz Biotechnology,Inc)、抗 SUMO-1 抗体 (#4972,Cell Signaling)、ヤギ抗マウス IgG-HRP 抗体 (sc2005,Santa Cruz Biotechnology,Inc)、ヤギ抗ウサギ IgG-HRP 抗体 (sc2004,Santa Cruz Biotechnology,Inc)、Alexa Fluor® 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (A11001,Molecular Probes)、Rhodamine Red -X-conjugated AffiniPure ロバ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (#711-295-152,Jackson ImmunoResearch) はそれぞれ市販のものを購入した。

## トランスフェクションおよび安定発現細胞株の作製

一過性発現系では6穴プレート (Corning) に細胞を1穴あたり  $2 \times 10^5$  個撒き、抗生物質を含まない10%ウシ胎児血清入りのD-MEM培地で12時間培養した。D-MEM培地  $250 \mu\text{l}$  にプラスミドDNAを  $4 \mu\text{g}$ 、D-MEM培地  $250 \mu\text{l}$  にLipofectamine2000 (Invitrogen)を  $10 \mu\text{l}$

1それぞれ加え、5分後に2つの溶液を混合した。20分間室温で静置した後に各穴に加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で48時間培養した。安定発現細胞株樹立のためp3xFLAG-SNARK及びp3xFLAG-SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>を上記の通りHeLa細胞ならびにPLC/PRF/5細胞にトランスフェクションし48時間培養後、100mmシャーレ (Corning) に1×10<sup>5</sup>個撒き直した。その後終濃度750 μg/mlのG418 (CALBIOCHEM) を含む10%血清入りD-MEM培地で2週間培養した。選択された細胞がコロニーを形成したことを確認し、各トランスフェクタントからそれぞれ32個のコロニーをサブクロニングした。細胞の回収は細かく切断し滅菌したろ紙をトリプシンに浸潤させ、ろ紙をコロニーの上に3分静置した後、ろ紙ごと96穴プレート (Corning) に移して行った。各クローンを750 μg/mlのG418を加えた10%血清入りD-MEM培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。細胞がサブコンフルエントになったところで24穴プレート (Corning) へ、さらに同様に6穴プレートへと移した。最終的にトランスフェクションから4週間後に細胞を回収し、SNARKの発現をウエスタンブロットにより確認した。

### 細胞蛍光染色

SNARKの野生型および変異体を一過性あるいは安定発現するHeLa細胞ならびにPLC/PRF/5細胞を35mmガラスボトムディッシュ (松浪ガラス) に1×10<sup>5</sup>個撒き、D-MEM培地で24時間培養した。D-MEM培地を吸引除去した後PBSで2回洗い、アセトン/メタノ

ール混合液(アセトン:メタノール=1:1)を加え、室温で 10 分固定した。固定後、PBSで 2 回洗い、2%ウシ血清アルブミン含有PBSを加え、37℃、1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、2%ウシ血清アルブミン含有PBSに一次抗体を加え、室温で 1 時間 1 次抗体反応を行った。PBSで 3 回洗った後、2%ウシ血清アルブミン含有PBSに化学蛍光標識された 2 次抗体を加え、室温で 1 時間 2 次抗体反応を行った。なお核も染色する場合には Propidium Iodide (Molecular Probes) を終濃度  $2 \mu\text{g/ml}$ 、RNase A (BOEHRINGER MANNHEIM) を終濃度  $20 \mu\text{g/ml}$ になるように加えた。PBSで 3 回洗った後、退色保護剤であるFluoro Guard Reagent (BIO-RAD) を加え、カバーガラスで封入した。観察および画像解析には共焦点顕微鏡システムLSM5 PASCAL (ZEISS) を用いた。なお、AMPK- $\alpha$  1、 $\alpha$  2 およびSNARKを染色するのに 1 次抗体は抗FLAG M2 抗体を 500 倍希釈、2 次抗体に Alexa488 ヤギ抗マウス抗体を 1000 倍希釈して用いた。EGFPを観察する場合には抗体を用いず、核染色は上記と同じように行った。PMLを染色するのに 1 次抗体は抗PML抗体を 200 倍希釈、2 次抗体にRhodaminロバ抗ウサギ抗体を 200 倍希釈して用いた。また、SUMO-1 を染色するのに 1 次抗体は抗SUMO-1 抗体を 200 倍希釈、2 次抗体にRhodmaine ロバ抗ウサギ抗体を 200 倍希釈して用いた。

## ウエスタンブロット

SNARKの野生型および変異体を一過性あるいは安定発現するHeLa細胞および

PLC/PRF/5 細胞を 6 穴プレートの 1 穴あたり  $2 \times 10^5$  個撒き、48 時間培養した。D-MEM培地を吸引除去した後PBSで 2 回洗い、SDS Lysis Buffer (10%SDS、100mM Tris-HCl (pH7.4)、10mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )を 1wellあたり  $100 \mu\text{l}$ 加えた。セルスクレーパーで細胞を剥離し 1.5mlチューブに回収、 $100^\circ\text{C}$ 、3 分で酵素反応を失活させた後、超音波によりゲノムDNAを切断した。 $17400\text{g}$ 、10 分、室温で遠心した後、上清を採った。タンパク質濃度はBCA Protein Assay Kit For Protein Assays Using Bicinchoninic Acid (PIERCE) を用いて決定した。 $10 \mu\text{g}$ のタンパク質を 8% SDS-PAGEで泳動、分離した。分離したタンパク質はセミドライトランスファー装置 (BIO-RAD) を用いてPVDFメンブレン (MILLIPORE) にトランスファーした。PBSに 5%スキムミルク、0.1% Tween20 を含むブロッキング溶液で 1 時間ブロッキングした後、ブロッキング溶液に 1 次抗体を加え、 $4^\circ\text{C}$ 、一晩振盪しながら 1 次抗体反応を行った。TPBS (0.01% Tween20 を含むPBS)で各 10 分、5 回洗った後、ブロッキング溶液に 2 次抗体を含む溶液で、室温 1 時間振盪し、2 次抗体反応を行った。TPBS で 10 分、5 回洗った後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) で発光させてX線フィルムに感光、検出した。なお、SNARKおよび各変異体を検出するのに 1 次抗体は抗FLAG M2 抗体を 10000 倍希釈、2 次抗体にはヤギ抗マウスIgG-HRP抗体を 10000 倍希釈して用いた。EGFPおよびEGFP融合タンパク質を検出するのに 1 次抗体は抗 GFP(FL)抗体を 5000 倍希釈、2 次抗体にはヤギ抗ウサギIgG-HRP抗体を 5000 倍希釈して用いた。

## 結果

### SNARK および AMPK の細胞内局在

培養細胞に強制発現させた SNARK 及び AMPK- $\alpha$  1、 $\alpha$  2 の細胞内局在を調べた。N 末端に FLAG エピトープタグを融合したヒト SNARK 及び AMPK- $\alpha$  1、 $\alpha$  2 の発現プラスミドを子宮頸がん細胞 HeLa 及び肝がん細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、融合タンパク質を抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法で染色し、核を Propidium Iodide (PI) で染色した。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。AMPK- $\alpha$  1 および  $\alpha$  2 は細胞質に存在したのに対し、SNARK は大部分が核に存在し、細胞質にもわずかに存在した (Fig.2)。核内に存在する SNARK は核小体以外の核全体に拡散して中には顆粒状に存在するものもあった (Fig.2 arrow)。

### SNARK の NLS 候補の検索

核移行するタンパク質は、核輸送タンパク質である Importin  $\alpha$  に核移行シグナル配列 (NLS) を認識され核に輸送される。Importin  $\alpha$  の認識する配列は monopartite 型 NLS と bipartite 型 NLS があり、monopartite 型 NLS は K(K/R)X(K/R) を、bipartite 型 NLS は KRX<sub>10-12</sub>KRRK をそれぞれ共通配列として持つ。そこで SNARK に NLS の共通配列にマッチするものがあるかを調べた。その結果、ヒト SNARK のアミノ酸一次構造から monopartite



型NLSにマッチする配列はヒトSNARKのアミノ酸残基 68~71 (<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>)、375~379 (<sup>375</sup>KKSR<sup>378</sup>)、450~453 (<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>) の3つが見つかり、bipartite型NLSにマッチする配列は見つからなかった(Fig.3a)。また、ヒトと同様にマウスおよびラットSNARKのアミノ酸一次構造解析を行ったところ 3ヶ所のmonopartite型NLSの共通配列に合う部分はいずれも種間を越えて強く保存されていた(Fig.3b)。

### SNARK の部分欠損変異体の細胞内局在

予測されたNLSのうち実際にSNARKの核移行に必要なものを同定するために、SNARKの部分欠損変異体を挿入したプラスミドを構築した(Fig.4a)。SNARK-(2-447)は628アミノ酸から構成されるSNARKの2~447番目までのアミノ酸から成る変異体で<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>、<sup>375</sup>KKSR<sup>378</sup>を含む。SNARK-(2-370)およびSNARK-(2-169)はそれぞれSNARKの2~370、2~169番目までのアミノ酸から成り、<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>のみを含む。SNARK-(78-447)はSNARKの78~447番目までのアミノ酸から成り、<sup>375</sup>KKSR<sup>378</sup>のみを含む。SNARK-(311-628)はSNARKの311~628番目までのアミノ酸から成り、<sup>375</sup>KKSR<sup>378</sup>、<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を含む。SNARK-(390-628)はSNARKの390~628番目までのアミノ酸から成り、<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>のみを含む。またSNARK-(2-447)、SNARK-(2-370)の2つはAMPKファミリーで保存されたセリン/スレオニンキナーゼの触媒ドメインを含有し、他の変異体は触媒ドメインを欠損している。これら部分欠損変異体はN末端にFLAGが融合するように構築した。作製したプラス

ミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、部分欠損変異体が発現することを抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した(Fig.4b)。C末端の448残基以降を持つ変異体及び野生型の移動距離から換算した分子量はアミノ酸配列から予想した分子量より約10kD大きかったが、他の変異体は予想した分子量通りにバンドが検出された。次にこれらの変異体をHeLa細胞にトランスフェクションし、細胞内局在を調べた(Fig.5)。<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含むSNARK-(2-447)、SNARK-(2-370)、SNARK-(2-169)は野生型と同様に核に優位に局在した。<sup>375</sup>KKSR<sup>378</sup>のみを含むSNARK-(78-447)は細胞質のみに分布した。<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含まず<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を含むSNARK-(311-628)、SNARK-(390-628)は若干核に分布するも細胞質に優位に局在した。これらの結果、<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>がSNARKのNLSであると考えられた。

#### SNARK-N 末端融合 EGFP の細胞内局在

<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>が単独でNLSの活性を持つことを確認するために、<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含むSNARKのN末端断片SNARK-(1-169)をEGFPに融合した(1-169)-EGFPを発現するプラスミドを構築した(Fig.6a)。HeLa細胞に一過性に発現させた(1-169)-EGFPの分子量、発現量を抗GFP抗体によるウエスタンブロットで確認した(Fig.6b)。移動距離から換算した分子量は46kDであり、EGFPの25kDと共に予想した分子量と一致した。続いてHeLa細胞にトランスフェクションし(1-169)-EGFPの細胞内局在を調べた(Fig.6c)。GFP単独では核と細胞質の両方に拡散しているのに対し、(1-169)-EGFPは核のみに存在した。ただし核内分布は野生型の

SNARKと異なり核小体を含む核全体に拡散した。これよりSNARKのN末端 1~169 残基はタンパク質の核移行に十分であることが示された。

### SNARK 点変異体の細胞内局在

$^{68}\text{KKAR}^{71}$ がタンパク質の核移行に必要な十分であるか確認するために、NLSの塩基性アミノ酸のリジンアラニンに換えたSNARKのNLS点変異体の細胞内局在を調べた。SNARKの $^{68}\text{KKAR}^{71}$ を $^{68}\text{AAAR}^{71}$ に換えた点変異体SNARK- $^{68}\text{AAAR}^{71}$ を発現するプラスミドを作製した(Fig.7a)。また部分欠損変異体の細胞内局在の結果、 $^{450}\text{KKPR}^{453}$ を含む変異体も若干核に存在したことから、 $^{450}\text{KKPR}^{453}$ を $^{450}\text{AAPR}^{453}$ に換えた点変異体SNARK- $^{450}\text{AAPR}^{453}$ も作製した。 $^{68}\text{KKAR}^{71}$ 、 $^{450}\text{KKPR}^{453}$ の両方が協同してSNARKのNLSとして機能しているかもしれないので $^{68}\text{AAAR}^{71}$ 、 $^{450}\text{AAPR}^{453}$ に換えた点変異体SNARK-( $^{68}\text{AAAR}^{71}$ - $^{450}\text{AAPR}^{453}$ )も作製した。全てのプラスミドはN末端にエピトープタグ 3xFLAGが融合するように設計した。各変異体をHeLa細胞に発現させて抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット法により分子量および発現量を確認した(Fig.7b)。この変異体および野生型でも移動距離から換算した分子量は予想よりも 10kD大きくなった。次に各変異体をHeLa細胞に一過性に発現させ細胞内局在を観察した。SNARK- $^{68}\text{AAAR}^{71}$ 及びSNARK-( $^{68}\text{AAAR}^{71}$ - $^{450}\text{AAPR}^{453}$ )は一部核内にも存在したが、細胞質に優位に存在した(Fig.8)。一方SNARK- $^{450}\text{AAPR}^{453}$ は主に核に局在した。SNARK- $^{68}\text{AAAR}^{71}$ とSNARK-( $^{68}\text{AAAR}^{71}$ - $^{450}\text{AAPR}^{453}$ )の細胞内分布には大きな差が見ら

れなかった。細胞内局在がトランスフェクションのストレスに因らない事を確認するためにHeLa細胞およびPLC/PRF/5 細胞にSNARK、SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>をそれぞれ安定発現させ細胞内局在を調べた。安定発現系でも一過性発現系と同様の細胞内局在を示した(Fig.9)。細胞内局在パターンは一過性発現系と安定発現系では変わらず、トランスフェクションのストレスによる分布への影響は無かった。また細胞種による細胞内局在の分布の違いは見られなかったが、HeLa細胞ではPLC/PRF/5 細胞に比べて核に存在するSNARKの顆粒体形成が多く見られた。

#### 様々な刺激による SNARK の核内分布の変化

SNARK は UV 照射やグルコースやアミノ酸の欠乏に曝露した細胞中で SNARK のキナーゼ活性が上昇すると報告されているので、これらの刺激によって 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 PLC/PRF/5 細胞に 20mJ の UV を照射し、30 分、2 時間後に SNARK の局在に変化があるかを観察した(Fig.10)。刺激前は SNARK は核小体以外の核内に拡散して分布したのに対し、UV 照射した場合には SNARK は顆粒体を多く形成した。また 30 分に比べ 2 時間では顆粒体の数が多くなった。UV 照射により SNARK の核内分布が変化したことから、UV 照射後の SNARK の核内分布がどのような経時的変化を示すか観察した(Fig.11)。その結果、SNARK は UV 照射後 30 分から顆粒体を形成し始め 2 時間で最も多くなった。そして UV 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。次にグルコース及びアミノ酸を抜いた培地で PLC/PRF/5 を 2 時間、24 時間培養した場合の SNARK の局在について観察した。この場合 SNARK は通常と同じように核内に拡散し、顆粒体の形成は見られなかった(Fig.10)。

### SNARK と相互作用するタンパク質の探索

SNARK と相互作用するタンパク質を探すために、まず SNARK が UV 照射後に核内で顆粒状に存在することに着目し、SNARK の顆粒体と局在が合致する核タンパク質を調べた。核内は細胞内と同じようにいくつかのドメインにより構成されている。中でも PML ボディには UV 照射後にリン酸化される p53 が含まれるので PML ボディと SNARK の像が一致するかを共染色で調べた(Fig.12)。UV 照射前の SNARK は核内に拡散して分布しているため PML との共局在は不明だった。UV 照射後に形成される SNARK の顆粒体のうち PML と重なるものはあるが、ほとんどの顆粒体では像が一致しなかった。また局在パターンに類似性が見られなかった。すでに述べたように SNARK の C 末端配列を持つものにおいて、SDS-PAGE 電気泳動の移動距離から換算した分子量はアミノ酸配列から予想される分子量より約 10kD 大きくなった。これより SNARK は修飾を受けている可能性が考えられたため、核タンパク質を共有結合修飾して核内分布を制御しているユビキチン類似タンパク質である SUMO-1 と SNARK の像が一致するかを調べた(Fig.12)。その結果、SNARK の顆粒体と SUMO-1 の像は全く一致しなかった。

## 考察

### SNARK は核に局在するキナーゼである

本研究で AMPK ファミリーである SNARK は一過性発現系でも安定発現系でも核内に局在することが示された。また、発現量の違いによる局在への影響も見られなかった。これより SNARK は定常状態で核に移行する核タンパク質であると推測され、SNARK の基質が核タンパク質あるいは核酸である可能性が示唆される。基質を特定することは SNARK の関わるシグナル伝達系を明らかにするのに非常に有効な手段のため、本研究は SNARK の生理機能解析の重要な突破口になると考えられる。

### SNARK の NLS の特定

SNARK の部分欠損変異体を用いた実験から SNARK の NLS の候補が<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>に絞り込まれた。しかしながら<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含まず<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を含む変異体でも一部核局在が見られた。NLS を特定するために 2 つの実験で確かめる必要があった。第一として<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含む SNARK の N 末端を EGFP に融合し、EGFP が核のみに局在することを確かめる実験である。EGFP は通常核、細胞質両方に存在するが、代表的な monopartite 型 NLS である SV40T 抗原の NLS を融合した EGFP は核のみに存在することが知られている [29, 30]。SNARK の N 末端を融合した EGFP もまた核のみに局在したため、融合した SNARK の N 末端が NLS とし

て機能することが判明した。ただし核内分布が野生型と異なり核小体にも分布したため、SNARKの核内分布についてはC末端側が制御していると考えられる。さらにアミノ酸配列の相同性からNLSの候補とした<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>が確かにNLSとして機能することを確定するためには点変異体が核移行しないことを確認する実験が必要である。一方部分欠損変異体の結果から<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を含む変異体でも一部に核局在が見られた。そこでSNARKの<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>に換えた点変異体SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>と<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>に換えた点変異体SNARK-<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>及び<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>、<sup>450</sup>KKPR<sup>453</sup>を<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>、<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>に換えた点変異体SNARK-(<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>-<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>)の細胞内局在について観察した。その結果、SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>とSNARK-(<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>-<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>)は主に細胞質に分布した。また2つの変異体の間には分布に大きな差は見られなかった。一方SNARK-<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>は野生型と同様に主に核に存在した。これより<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>がSNARKのNLSであると推測される。本研究で示されたNLSはSV40T抗原と同様のmonopartite型NLSであった。AMPKファミリーにおいてNLSが同定されたのは本研究が初めてである。AMPK- $\alpha 2$ も場合によっては核に局在することが報告されており、今回の研究の成果が $\alpha 2$ の核局在に働くNLSの同定にも役立つと考えられる[31, 32]。

#### UV 照射による SNARK の核内分布の変化

SNARK は UV 照射をしたラットケラチノサイトに誘導される cDNA として最初に同定

された。したがって UV 照射によって引き起こされる細胞の生理的反応に SNARK が重要な働きをする可能性があると考えた。FLAG 融合 SNARK を安定発現する PLC/PRF/5 細胞を用い UV 照射すると、30 分後から顆粒体が増加、2 時間で最も顕著になり 4 時間後には UV 照射前と同様に核全体に拡散した。時間経過と共に核内の顆粒体の数が多くなることから SNARK が UV 照射に応答し機能すると推測される。ATM 遺伝子はガンマ線に対して感受性の高い毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) の原因遺伝子で、電離放射線による DNA 傷害に対する細胞の反応に重要な役割を果たしている[33]。最近 ATM が UV 照射による DNA 損傷に反応し、UV 照射後 30 分からリン酸化が始まり 2 時間でピークとなり 4 時間後には 2 時間と比べてリン酸化が減少することが報告されている[34]。この活性化の時間的变化と今回の実験で得られた SNARK の核内での挙動が良く一致した。SNARK が UV 照射後に誘導されたことと考え合わせると、SNARK が DNA 損傷応答に関わる可能性が推測される。今後 SNARK がどのように活性化されるのか詳細な解析が必要である。

一方、AMPK はエネルギー状態を感知し活性化される。実際 *in vitro* の実験からグルコース欠乏下で SNARK の活性が上昇することも知られている。しかし本研究においてグルコース、アミノ酸欠如培地での栄養飢餓刺激では SNARK の核内の動きに変化は見られなかった。ただし細胞内ストレスと SNARK の活性化には細胞ごとに特異性があることが報告されているので、栄養飢餓ストレスによる SNARK の活性化と核内局在の変化については今後詳細な検討が必要である[22]。



## SNARK の修飾因子

SNARK の部分欠損変異体の結果、SNARK の C 末端側である 448~628 のアミノ酸残基を含む変異体および野生型では分子量が予想よりも約 10kD 大きく検出された。SNARK-NLS 点変異体においても同様に 10kD 大きく検出された。本研究で用いたタンパク質抽出液は 10%SDS からなる強力なイオン性界面活性剤なので、SNARK の分子量が大きくなるのは共有結合による修飾であると考えられる。共有結合によるタンパク質修飾因子としてユビキチンやユビキチン類似タンパク質が知られている。しかしながらこの修飾は SNARK の部分欠損変異体の結果から核移行および核内局在に関与していないことから修飾は細胞質で行われていると推測される。今回の論文にはデータを載せていないが、ユビキチンやユビキチン類似タンパク質である SUMO-1 の抗体を用いたウエスタンブロットでは強発現した SNARK を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し抗 SUMO-1 抗体によるウエスタンブロットで SUMO-1 化された SNARK を検出しようと試みたが、修飾は検出されなかった。翻訳後の修飾がどのような場合に起こるのか、どのような修飾であるか、またその修飾の生物学的意味は何であるかなどの問いは、SNARK に限らず多くのタンパク質の制御に関わる可能性もある。今後 SNARK の修飾について詳細な検討が必要である。

## 相互作用タンパク質の探索

今回検討した範囲では PML および SUMO-1 はいずれも SNARK と共局在しなかった。

PMLに関しては一部重なりが合ったが大部分が重ならず、また両者の局在パターンに類似性が乏しいことから SNARK と PML は相互作用していないと推測される。SUMO-1 に関しては全く重ならなかった。これはウエスタンブロットでも SNARK と相互作用していないことが明らかになっている。SNARK の所属する核内ドメインについては核ドメインに特異的なタンパク質に対する抗体を用いた染色実験を中心に検証する予定である。

## 今後の課題

今後は SNARK が紫外線照射により顆粒体を形成することに注目し、共局在実験と SNARK を bait とした相互作用解析を行いどのようなタンパク質あるいはクロマチン部位と結合しているかを検証する予定である。最近では核内ドメインの解析が進み、核タンパク質は適切なドメインで機能すると考えられているため、SNARK が属する核内ドメインを発見できれば SNARK の生理機能を解析する上で重要な手がかりとなるはずである。同様に SNARK と相互作用する、生理機能が既知なタンパク質が判明すれば、SNARK が関与する情報伝達経路が明らかになり、SNARK の生理機能が解明されると思われる。また SNARK の翻訳後修飾に関しては、その制御機構ならびに生物学的意味を明らかにするために、アミノ酸配列ならびに構造について研究する予定である。

## 謝辞

本研究を取り組むにあたり、恵まれた環境を与えてくださり、指導していただいた国立がんセンター東病院臨床開発センターセンター長兼東京大学新領域創成科学研究科がん先端生命科学分野教授江角浩安博士に感謝いたします。忙しい中ミーティングを始め、様々なご指導を頂き感謝しております。自由に研究出来たこの2年は充実したものでした。

研究の方針、手法を丁寧にご指導していただいた国立がんセンター臨床開発センターがん治療開発部微小環境標的療法室長土原一哉博士に深く感謝いたします。研究経験の浅い私に一から丁寧に何度もご指導くださいました。また発表や論文に関する丁寧なご指導は適切で、大変参考になりました。

ご自身の研究室のことでお忙しい中、親身になってご指導していただいた北陸大学薬学部生命情報科学教室教授小倉勤博士ならびに生理学研究所鈴木敦博士の両名に深く感謝します。些細な質問にも丁寧に答えていただき、また研究者としての生き方において学ぶことが多く、大変勉強になりました。

国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部部長松村保広博士を始め同セ

ンター薬理薬効室長小泉史明博士、生理活性物質研究室の杉山賢司博士、北陸大学薬学部  
生命情報科学教室の倉島由紀子先生、ならびにがん治療開発部の皆様には多くの助言を頂  
いたことを感謝します。また実験から研究者の精神に至るまで様々なご指導を下されたこ  
とを深く感謝します。

最後に、これまで経済的にも精神的にも支えてくださった両親ならびに兄に深く感謝し  
ます。

Table.1 プライマー

プラスミド名	プライマー名	配列
pcDNA3.1(+) -FLAG- SNARK	SNARK-F	5' -GAATTCATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAGTCGCTGGTTTTTCGCG-3'
	SNARK-R	5' -CTCGAGTCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCTCAGTGCCTGTTCG-3'
pFLAG-SNARK -(2-447)	SNK-D1-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGG-3'
	SNK-D2-R	5' -CCGAATTCTCAGCCCTTCTTGGGGAGCAGCGG-3'
pFLAG-SNARK -(2-370)	SNK-D1-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGG-3'
	SNK-D1-R	5' -CCGAATTCTCAGCGCTCCAGGCCAGGGGTGGT-3'
pFLAG-SNARK -(2-169)	SNK-D1-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGG-3'
	SNK-CD(-)-R	5' -CCGAATTCTCACTGATGGCAATAGTGCACGG-3'
pFLAG-SNARK -(78-447)	SNK-D2-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGTGGCCATCAAGTCAATCCGG-3'
	SNK-D2-R	5' -CCGAATTCTCAGCCCTTCTTGGGGAGCAGCGG-3'
pFLAG-SNARK -(311-628)	SNK-CD(-)-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGTGGGAGAGCAGGAGGCTCCG-3'
	SNK-D3-R	5' -CCGAATTCTCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCCT-3'
pFLAG-SNARK -(390-628)	SNK-D3-F	5' -GCCTCGAGATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGACACGGCTGATGACACTGCC-3'
	SNK-D3-R	5' -CCGAATTCTCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCCT-3'
pGFP-(1-169)	NLS-GFP-F3	5' -GCAACCGCGGACCATGGAGTCGCTGGTTTTTCGC-3'
	NLS-GFP-R3	5' -CCTCTAGAGTTCTGATGGCAATAG-3'

Table.1 プライマー (続き)

プラスミド名	プライマー名	配列
p3xFLAG-SNARK	3xF-EcoR I	5' -CGGAATTCCGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGGCGCTCC-3'
	3xF-Xba I	5' -CGTCTAGATCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCCTCAGTGC-3'
p3xFLAG-SNARK-68AAAR71	3xF-EcoR I	5' -CGGAATTCCGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGGCGCTCC-3'
	SNK-KKAR-F2	5' -AGGCGCCCCGAGCTCTCCCGCGCCGCCACCTTCCCGT-3'
	SNK-KKAR-F2	5' -AAAGGCACCTACGGGAAGGTGGCGGCGGCGGGAGAGCT-3'
	3xF-Xba I	5' -CGTCTAGATCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCCTCAGTGC-3'
p3xFLAG-SNARK-450AAPR453	3xF-EcoR I	5' -CGGAATTCCGAGTCGCTGGTTTTTCGCGCGGCGCTCC-3'
	SNK-KKPR-R2	5' -AGCCAGACTCGCGCTGTCGGGGTGCTGCGAGAATGCCCTT-3'
	SNK-KKPR-R2	5' -TCCCCAAGAAGGGCATTCTCGCAGCACCCCGACAGCGCGAGT-3'
	3xF-Xba I	5' -CGTCTAGATCAGGTGAGCTTTGAGCAGACCCTCAGTGC-3'

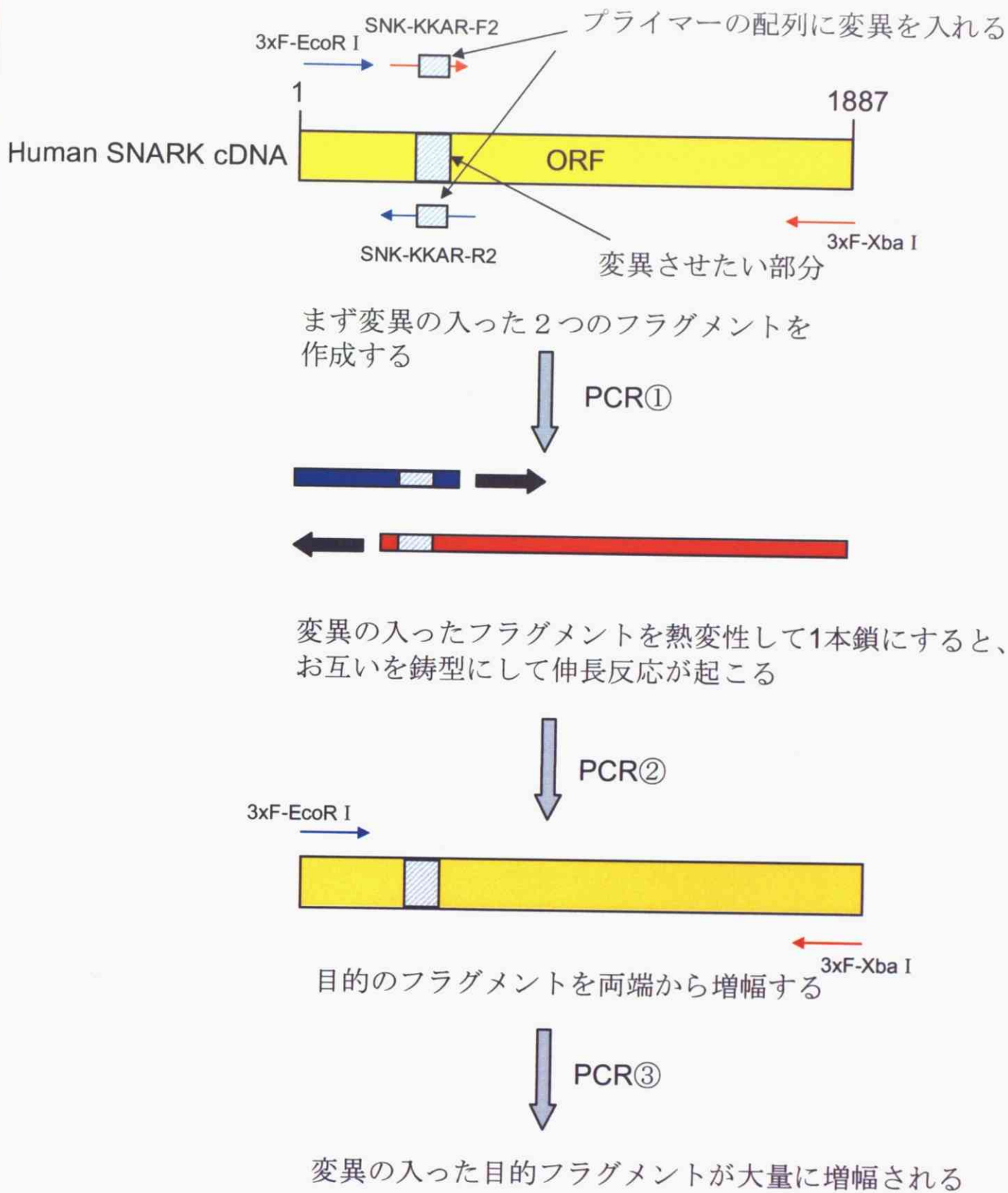


Fig.1 SNARKの点変異体のinsert fragmentの作製  
 SNARKの<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>に置換したのを例とした。

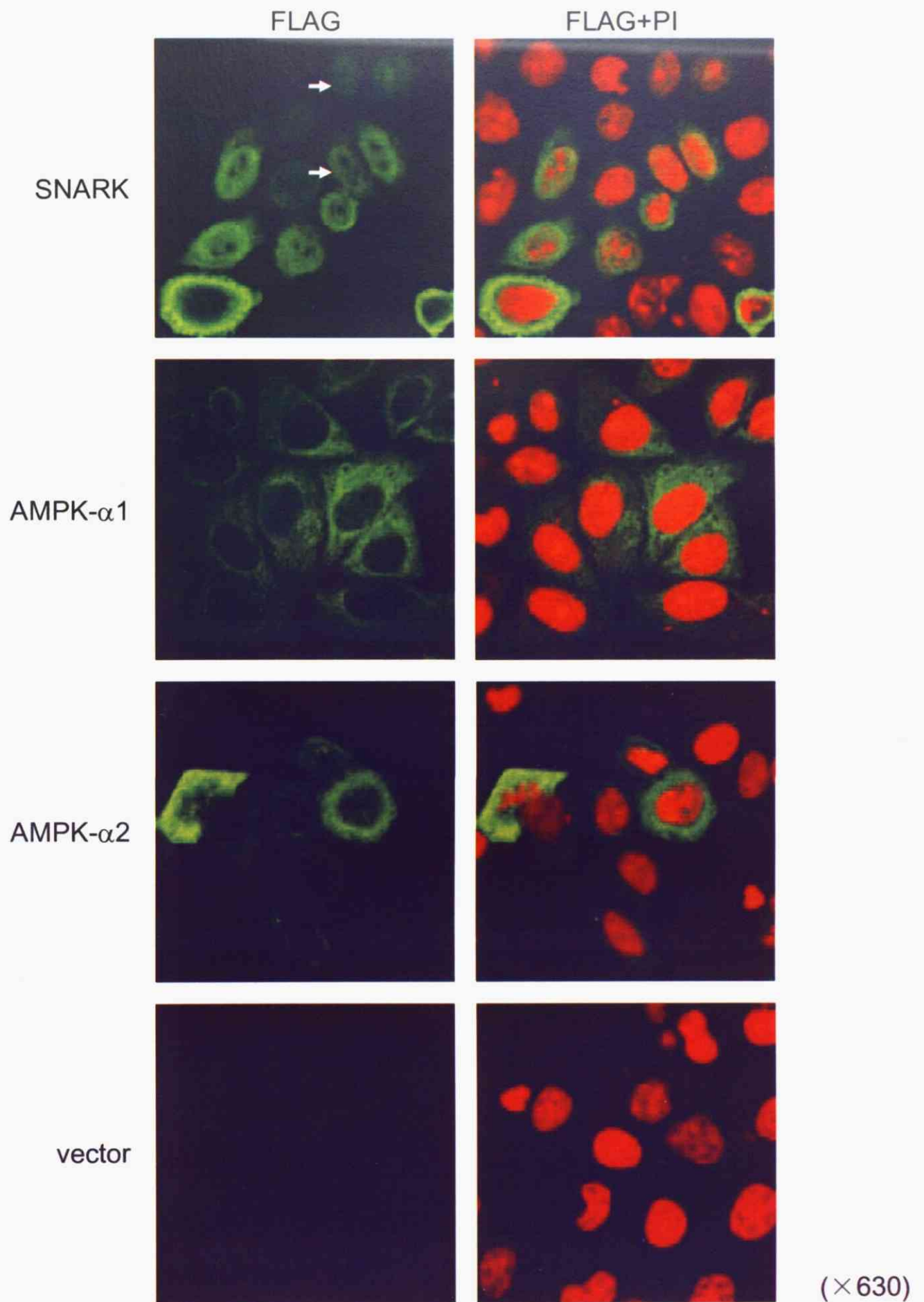


Fig.2 SNARKおよびAMPKの細胞内局在  
 FLAGタグを融合したSNARKおよびAMPKをHeLa細胞に一過性に発現させ、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法により蛍光標識し、共焦点顕微鏡で細胞内局在を調べた。AMPK-α1、2が細胞質に存在したのに対し、SNARKは主に核に存在した。白い矢印は顆粒体を形成している。  
 緑：抗FLAG-Alexa488、赤：PI



(a)

MESLVFARRSGPTPSAAELARPLAEGLIKSPKPLMKKQAVKRHHHKHN  
LRHRYEFLETGKGTYGKV**KKAR**ESSGRLVAIKSIRKDKIKDEQDLMHI  
RREIEIMSSLNHPHIIAIEVFENSSKIVIVMEYASRGDLYDYISERQQQLSE  
REARHFFRQIVSAVHYCHQNRVVHRDLKLENILLDANGNIKIADFGLSNL  
YHQGKFLQTFCGSPLYASPEIVNGKPYTGPEVDSWSLGLVLLYL VHGTM  
PFDGHDHKILVKQISNGAYREPPKPSDACGLIRWLLMVNPTRRATLEDV  
ASHWWVNWGYATRVGEQEAPHEGGHPGSDSARASMA DWLRRSSRP  
LLENGAKVCSFFKQHAPGGGSTTPGLERQHSL**KKSR**KENDMAQSLHS  
DTADDTAHRPGKSNLKLKPKGILKKKVSASAEGVQEDPPELSPIPASPGQ  
AAPLLPKKGIL**KKPR**QRESGYYSPEPSESGELLDAGDVFVSGDPKEQ  
KPPQASGLLLHRKGILKLNKFSQTALELAAPTTFGSLDELAPPRPLARA  
SRPSGAVSEDSILSSESFQDLPERLPEPPLRGCVSVDNLTGLEPPS  
EGPGSCLRRWRQDPLGDSCFSLTDCQEVTATYRQALRVCSKLT\*

(b)

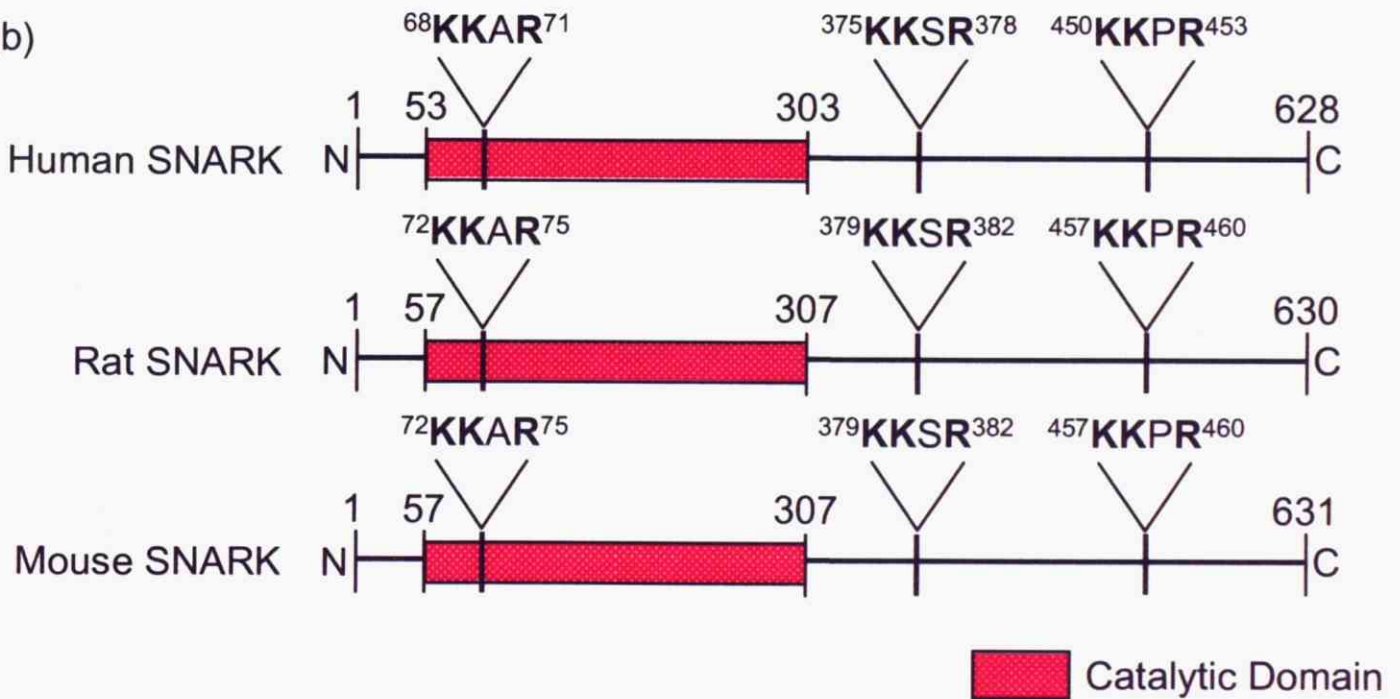


Fig.3 ヒトSNARKのNLS候補配列の同定

(a)ヒトSNARKのアミノ酸配列からmonopartite型NLSまたはbipartite型NLSの共通配列に合うものを探索した。赤い太字と下線で示されている部分がmonopartite型NLSの共通配列に合った部分である。bipartite型NLSの共通配列に合う部分は見つからなかった。(b)ヒトSNARKと同様にSNARKのcDNAの塩基配列が決定されている動物種でNLS共通配列に合う部分を探した。NLS候補は動物種を超えて強く保存されていた。

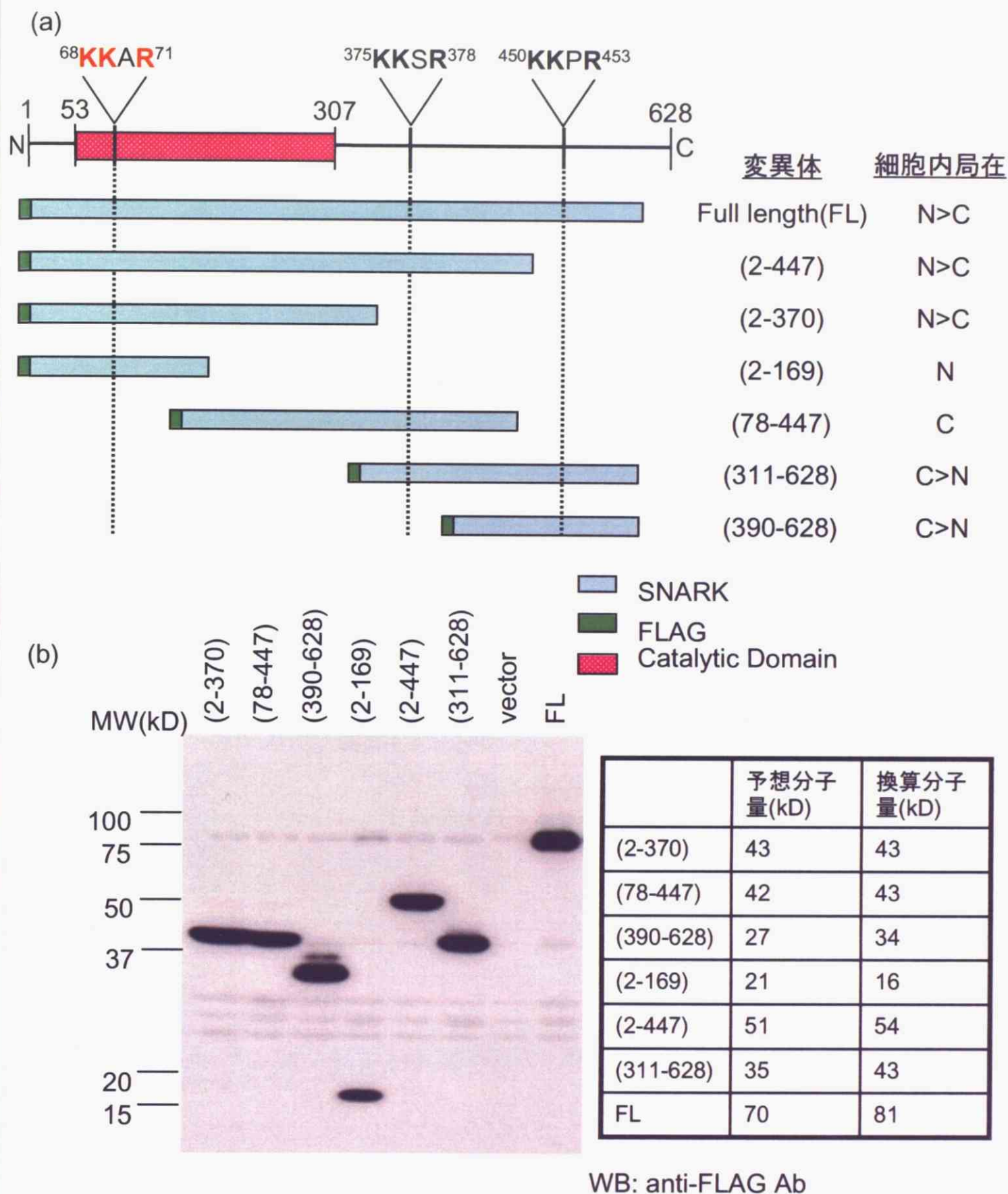


Fig.4 SNARK部分欠損変異体発現ベクターの構築

(a)SNARK部分欠損変異体発現ベクターの構築：アミノ酸一次構造から3ヶ所のNLSモチーフが予測された。これらを含む/含まないSNARK部分欠損変異体発現ベクターを構築した。右にFig.5により確認された各変異体の細胞内局在を示す。N：核局在、C：細胞質局在。(b)SNARK部分欠損変異体の発現：HeLa細胞に一過性発現させた各変異体のサイズ、発現量を抗FLAG抗体によるウエスタンブロットで確認した。

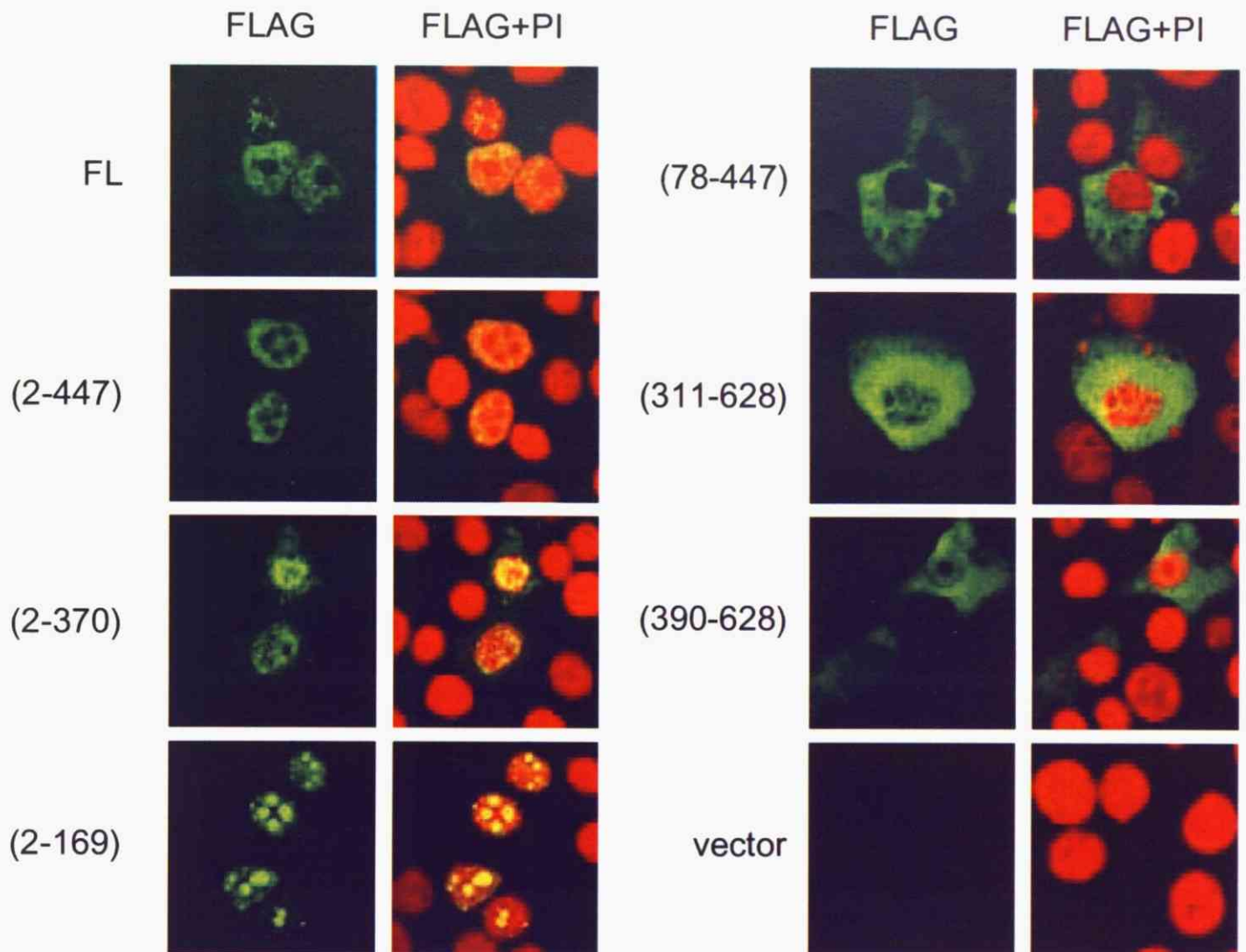


Fig.5 SNARK部分欠損変異体の細胞内局在

各変異体をHeLa細胞に一過性に発現させ、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法により細胞内局在を調べた。N末端側の<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含む変異体は主に核に局在したのに対しこれを含まない変異体は細胞質に存在した。緑：抗FLAG-Alexa488、赤：PI

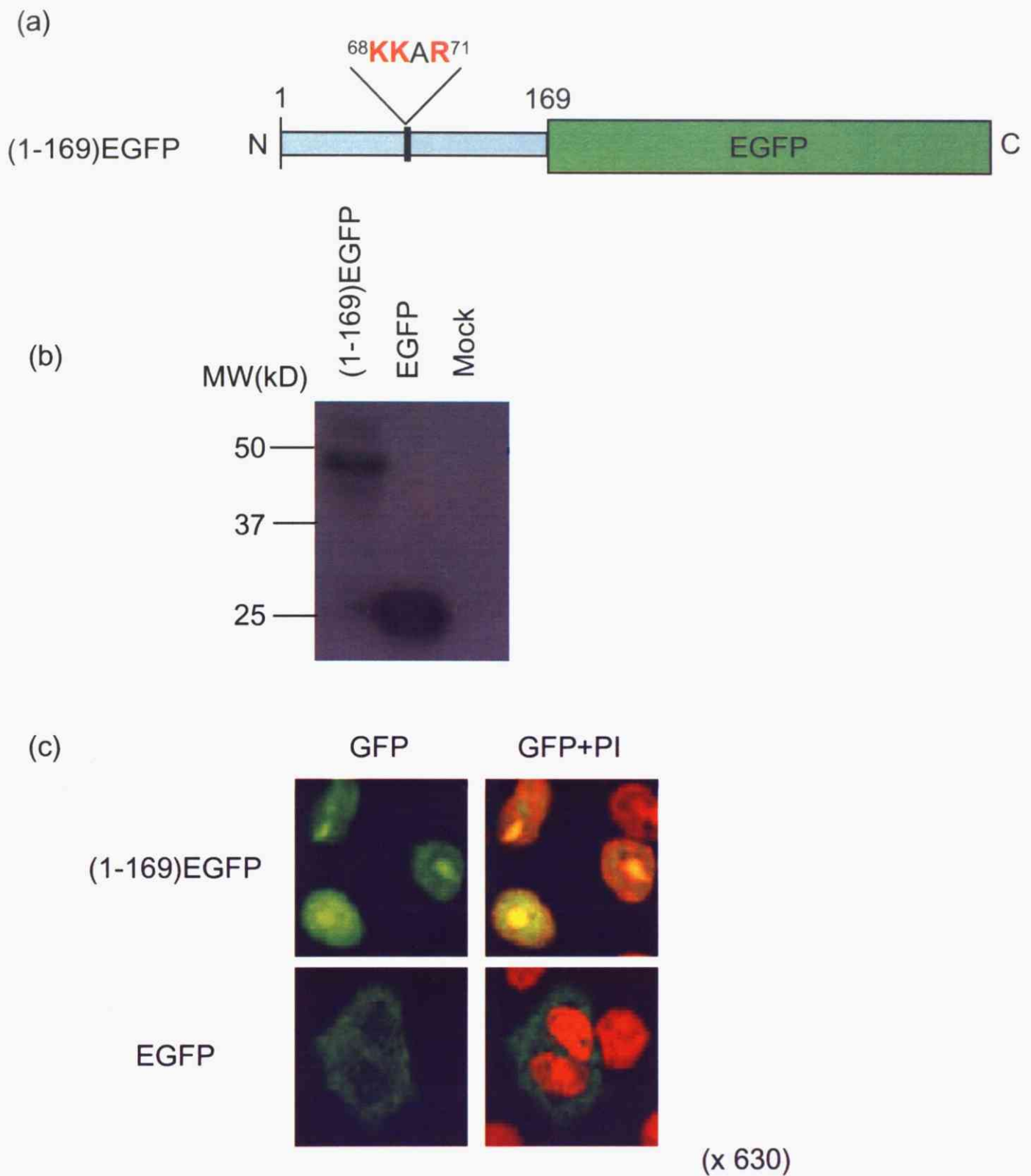


Fig.6 SNARK-N末端融合EGFPの核移行

(a)SNARK-N末端融合EGFP発現ベクターの構築：SNARKのNLS候補である<sup>68</sup>KKAR<sup>71</sup>を含むSNARKのN末端(1-169)をEGFPに融合したタンパク質(1-169)EGFPを発現するベクターを構築した。(b)SNARK-N末端融合EGFPの発現：HeLa細胞に一過性に発現させた(1-169)-EGFPのサイズ、発現量を抗GFP抗体によるウェスタンブロットで確認した。(c)SNARK-N末端融合EGFPの細胞内局在：HeLa細胞にSNARK-N末端融合EGFPを一過性に発現させ、EGFPの蛍光を共焦点顕微鏡で検出した。通常のEGFPは核、細胞質両方に存在するのに対し、SNARK-N末端融合EGFPは核に局在した。緑：EGFP、赤：PI

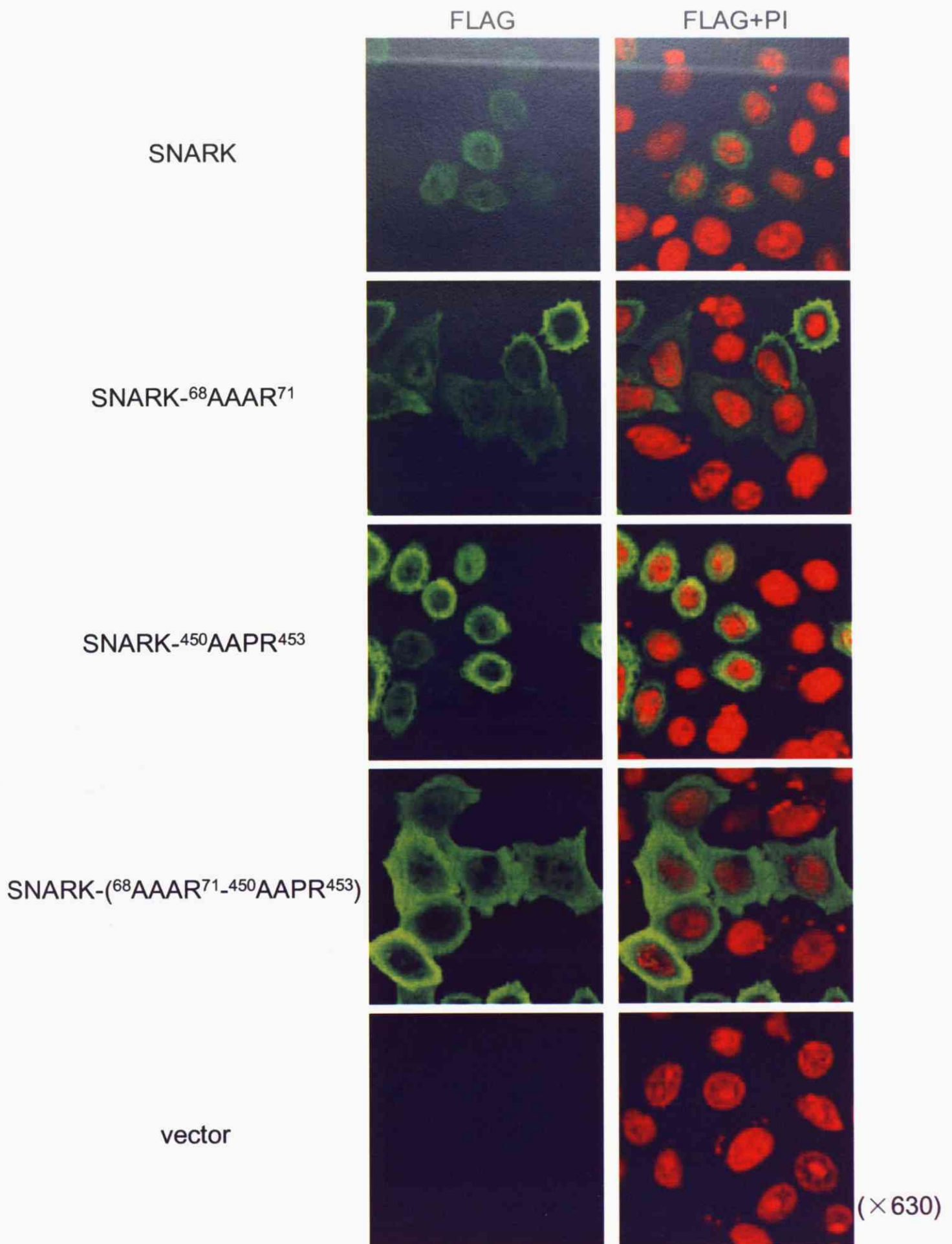


Fig.8 SNARK-NLS点変異体の一過性発現系における細胞内局在  
 各SNARK点変異体をHeLa細胞に一過性に発現させ、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法により細胞内局在を調べた。<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>変異を含む変異体は主に細胞質に局在した。また<sup>450</sup>AAPR<sup>453</sup>変異は局在に影響しなかった。緑：抗FLAG-Alexa488、赤：PI。

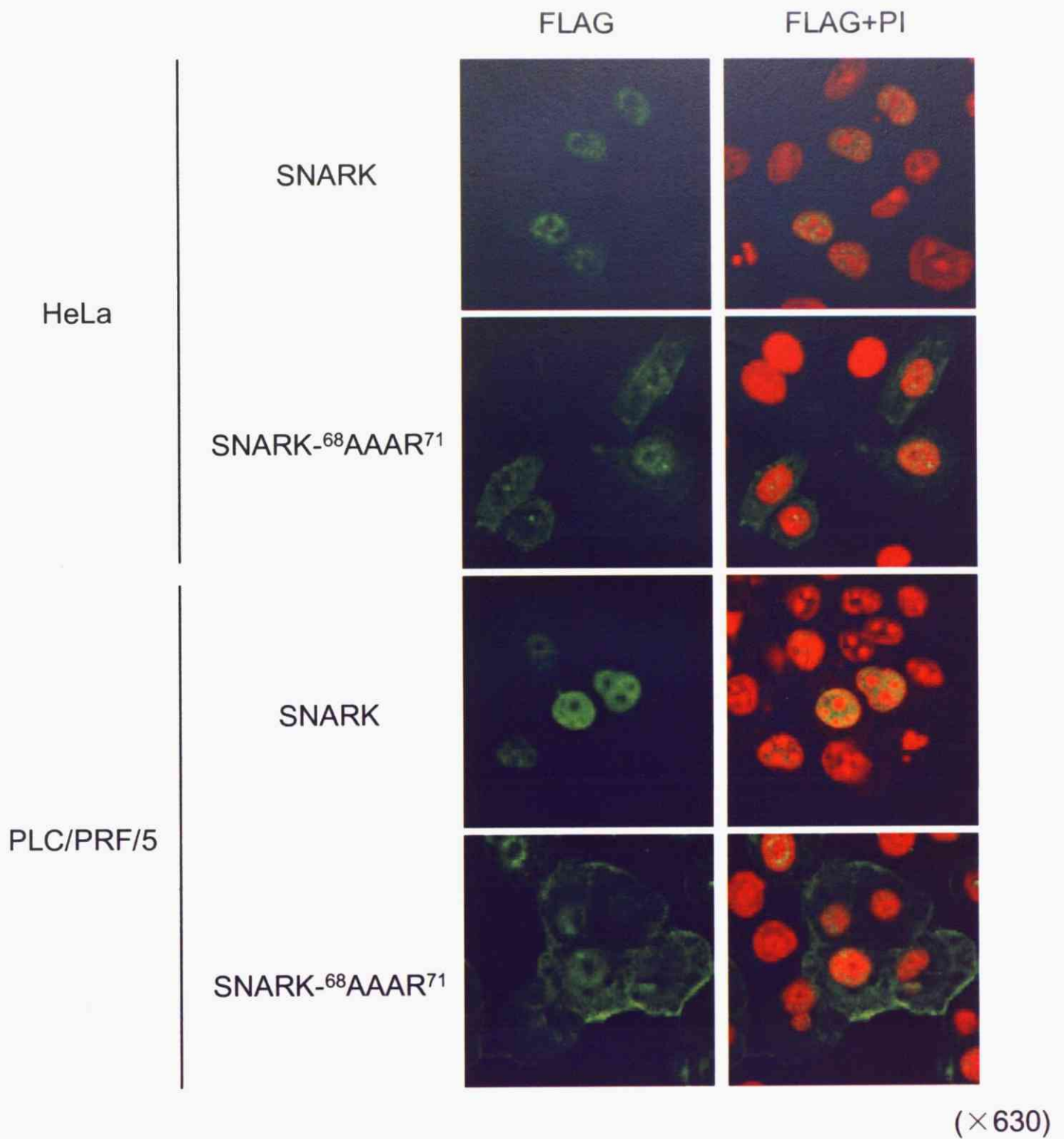


Fig.9 SNARK-NLS点変異体の安定発現系における細胞内局在  
 SNARKとNLS点変異体SNARK-<sup>68</sup>AAAR<sup>71</sup>をHeLa細胞およびPLC/PRF/5細胞に安定発現させ、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法により細胞内局在を調べた。野生型は核、変異体は細胞質に優位に局在する分布は一過性発現系と安定発現系で違いは見られなかった。また異なる細胞でも分布の違いは無かった。緑：抗FLAG-Alexa488、赤：PI

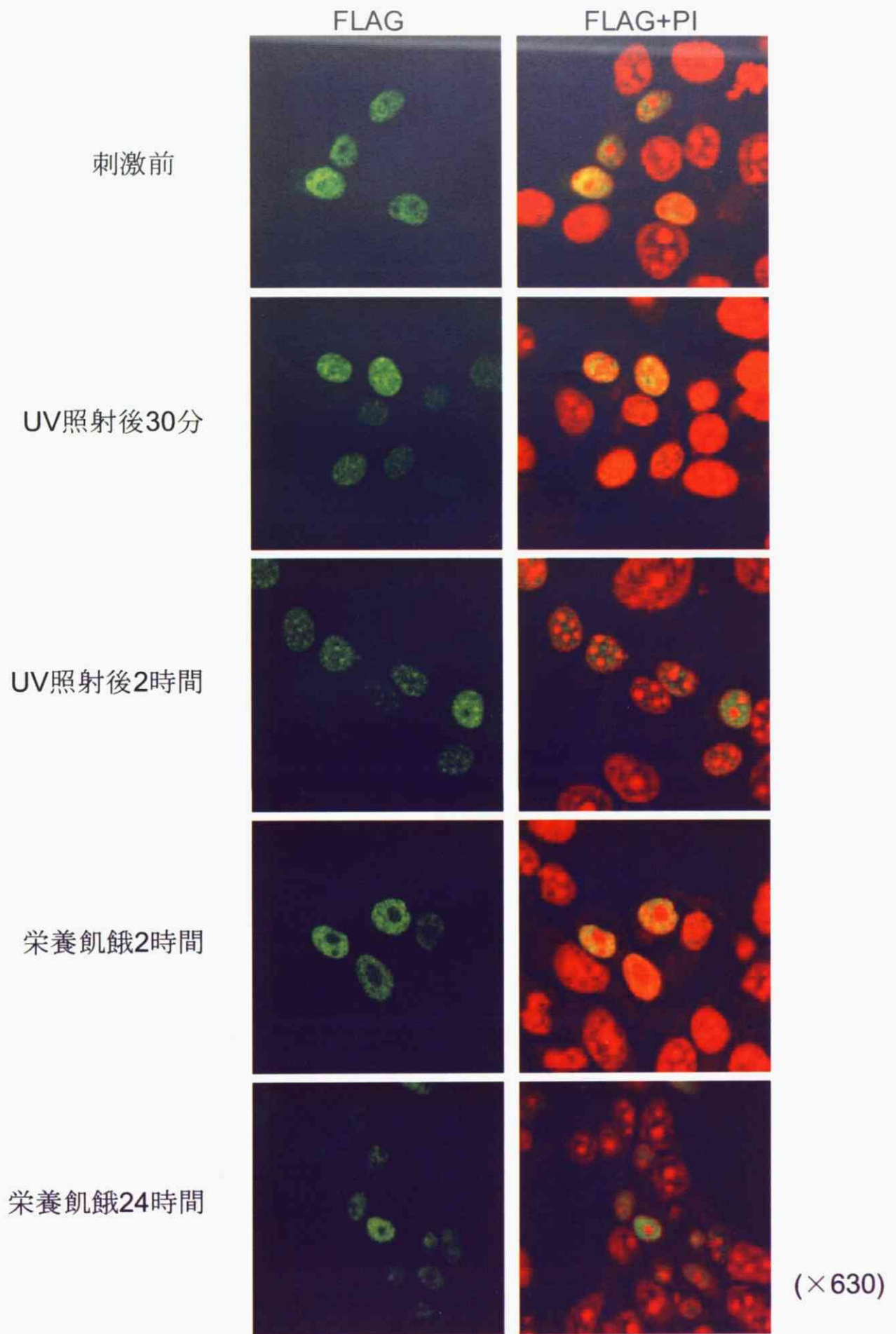


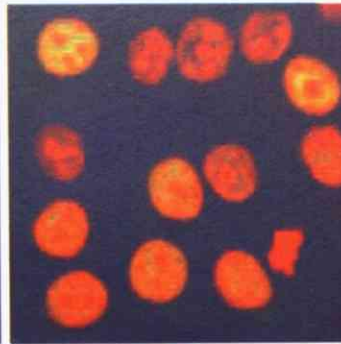
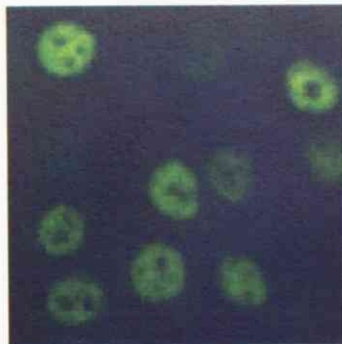
Fig.10 FLAG-SNARKを安定発現するPLC/PRF/5細胞に紫外線照射(UV-C 20mJ)、栄養飢餓刺激(グルコース、アミノ酸欠如培地で培養)を加えた後、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法によりSNARKの細胞内局在を観察した。紫外線照射後、SNARKは核内で顆粒状の分布を示した。一方栄養飢餓刺激ではSNARKの局在に明らかな変化は認められなかった。緑：抗FLAG-Alexa488、赤：PI

UV照射後

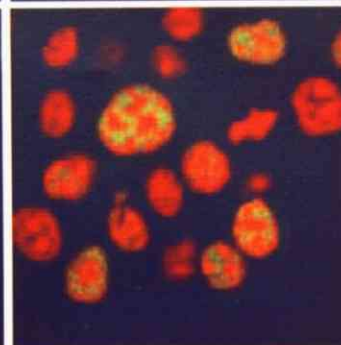
FLAG

FLAG+PI

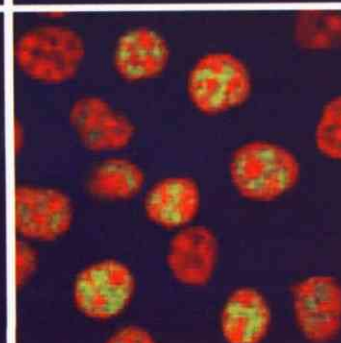
0時間



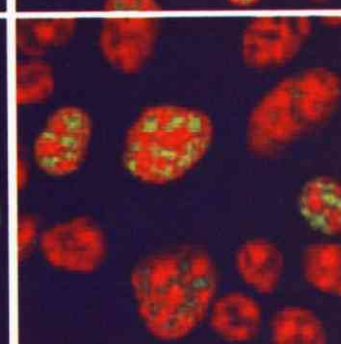
30分



1時間



2時間



4時間

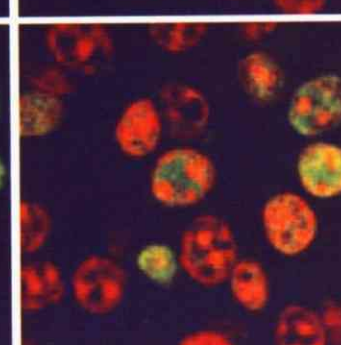
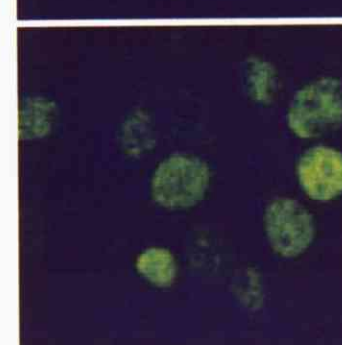
( $\times 630$ )

Fig.11 UV刺激によるSNARKの核内分布の経時変化

FLAG融合SNARKを安定発現するPLC/PRF/5細胞に20mJのUVを照射し、SNARKの核内分布の経時変化を観察した。SNARKの顆粒体形成はUV照射後30分から始まり、その傾向は2時間後で最も強くなっている。そして4時間後には照射前と同じように核全体に分布するようになった。



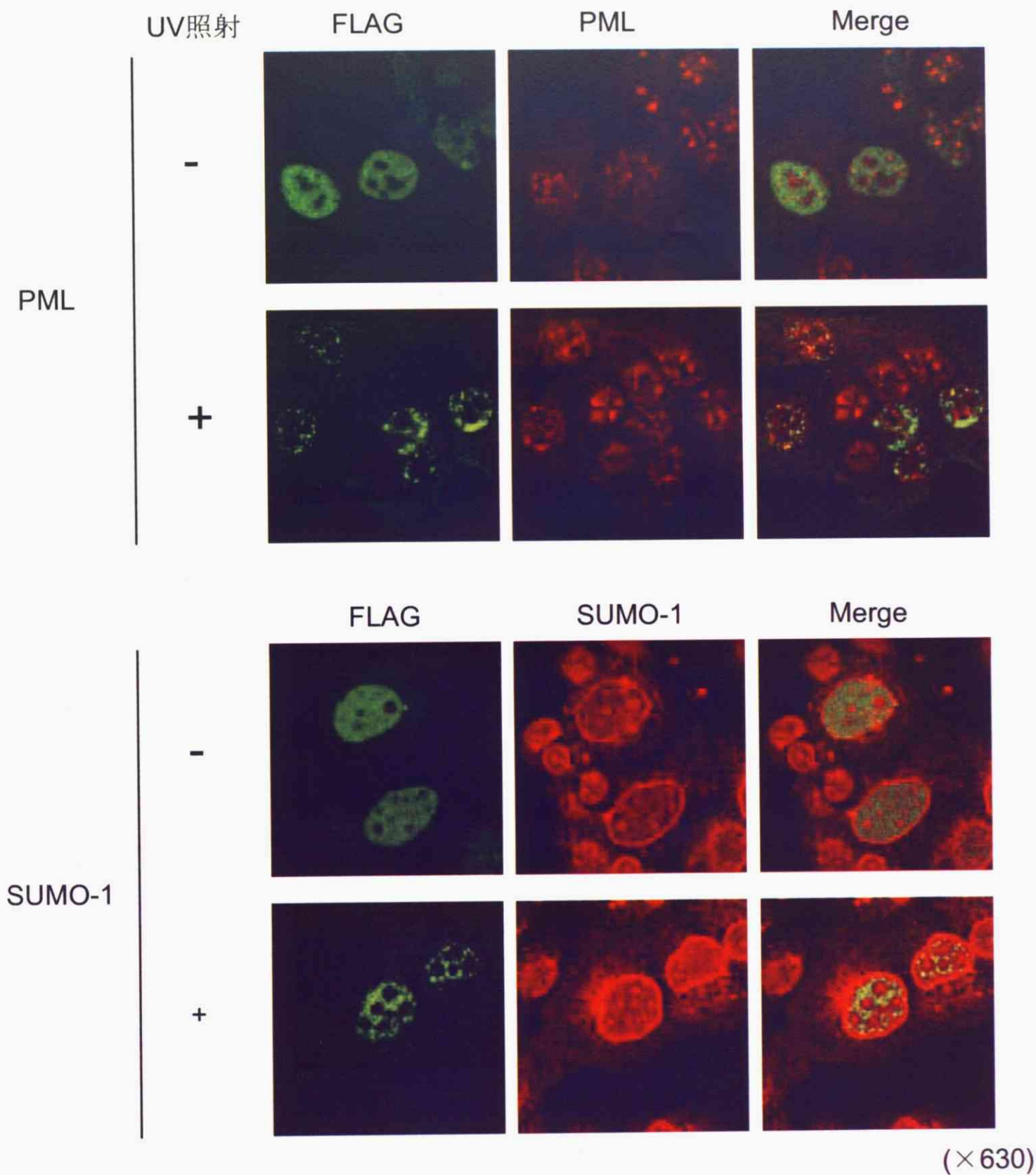


Fig.12 SNARKと各種タンパク質の共局在の有無  
 FLAG融合SNARKを安定発現するPLC/PRF/5細胞に20mJのUVを照射し、SNARKとPMLおよびSUMO-1の染色像が一致するかを調べた。PMLは若干像が重なるものが見えたが、大部分は一致しなかった。SUMO-1は全く一致しなかった。

## 参考文献

1. Carling, D., et al., *Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11442-8.
2. Sanz, P., *Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 1): p. 178-81.
3. Carling, D., *The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(1): p. 18-24.
4. Tsuchihara, K., et al., *5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) : A Cellular Fuel Gauge and Beyond*. Cell Technology, 2005. **24**(10): p. 1084-9.
5. Corton, J.M., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?* Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-65.
6. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase—fuel gauge of the mammalian cell?* Eur J Biochem, 1997. **246**(2): p. 259-73.
7. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1247-55.
8. Fryer, L.G., A. Parbu-Patel, and D. Carling, *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25226-32.
9. Choi, S.L., et al., *The regulation of AMP-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 92-7.
10. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
11. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
12. Minokoshi, Y., et al., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 569-74.
13. Hardie, D.G., *Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5179-83.
14. Stein, S.C., et al., *The regulation of AMP-activated protein kinase by*

- phosphorylation*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 3**: p. 437-43.
15. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. *J Biol*, 2003. **2(4)**: p. 28.
  16. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Curr Biol*, 2003. **13(22)**: p. 2004-8.
  17. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. *Cell Metab*, 2005. **2(1)**: p. 9-19.
  18. Lizcano, J.M., et al., *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1*. *Embo J*, 2004. **23(4)**: p. 833-43.
  19. Heyer, B.S., et al., *New member of the Snf1/AMPK kinase family, Melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo*. *Mol Reprod Dev*, 1997. **47(2)**: p. 148-56.
  20. Lefebvre, D.L., et al., *Identification and characterization of a novel sucrose-non-fermenting protein kinase/AMP-activated protein kinase-related protein kinase, SNARK*. *Biochem J*, 2001. **355(Pt 2)**: p. 297-305.
  21. Suzuki, A., et al., *Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278(1)**: p. 48-53.
  22. Lefebvre, D.L. and C.F. Rosen, *Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1724(1-2)**: p. 71-85.
  23. Suzuki, A., et al., *Induction of cell-cell detachment during glucose starvation through F-actin conversion by SNARK, the fourth member of the AMP-activated protein kinase catalytic subunit family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **311(1)**: p. 156-61.
  24. Legembre, P., et al., *Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness*. *J Biol Chem*, 2004. **279(45)**: p. 46742-7.
  25. Goldfarb, D.S., et al., *Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14(9)**: p. 505-14.
  26. Hodel, M.R., A.H. Corbett, and A.E. Hodel, *Dissection of a nuclear localization signal*. *J Biol Chem*, 2001. **276(2)**: p. 1317-25.
  27. Fontes, M.R., et al., *Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278(30)**: p. 27981-7.
  28. Izuishi, K., et al., *Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation*:

- possible new biochemical target for cancer therapy. Cancer Res, 2000. 60(21): p. 6201-7.*
29. Kruyt, F.A., et al., *Cytoplasmic localization of a functionally active Fanconi anemia group A-green fluorescent protein chimera in human 293 cells. Blood, 1997. 90(9): p. 3288-95.*
  30. Young, D.B., et al., *Identification of domains of ataxia-telangiectasia mutated required for nuclear localization and chromatin association. J Biol Chem, 2005. 280(30): p. 27587-94.*
  31. Salt, I., et al., *AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. Biochem J, 1998. 334 ( Pt 1): p. 177-87.*
  32. da Silva Xavier, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(8): p. 4023-8.*
  33. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *Initiating cellular stress responses. Cell, 2004. 118(1): p. 9-17.*
  34. Dodson, G.E. and R.S. Tibbetts, *DNA Replication Stress-induced Phosphorylation of Cyclic AMP Response Element-binding Protein Mediated by ATM. J Biol Chem, 2006. 281(3): p. 1692-7.*