

AMPK と TORC1 による小胞体ストレス応答機構

高木 亮輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 入江 賢児 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

小胞体は、翻訳されたタンパク質に正しい折り畳みや修飾を施す細胞小器官である。小胞体に変性タンパク質が蓄積すると(小胞体ストレス)、細胞は小胞体ストレス応答経路を活性化し、小胞体ストレスを軽減する。この小胞体ストレス応答経路は真核生物で高度に保存されている。哺乳動物細胞では、IRE1、PERK、ATF6 経路が知られている一方、出芽酵母では Ire1 経路のみが存在する^[1]。小胞体膜貫通型である Ire1 タンパク質は、小胞体内腔の変性タンパク質の蓄積を感知して活性化し、細胞質で *HAC1* mRNA のスプライシングを促進する。スプライシングされた *HAC1* mRNA から翻訳された Hac1 タンパク質は転写因子であり、核へ移行して小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現を誘導する。Ire1-Hac1 経路の活性化は、一時的であれど細胞の恒常性維持に寄与するが、持続的な活性化は細胞に対して毒性を示す^[1]。したがって、Ire1-Hac1 経路の適切な制御が細胞の恒常性維持にとって重要である。

我々の研究室では、出芽酵母 AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) オルソログである Snf1 タンパク質が、Ire1-Hac1 経路を負に制御することを見出してきた^[2]。しかしながら、Snf1 AMPK の下流で機能する因子は分かっておらず、Snf1 AMPK による詳細な Ire1-Hac1 経路制御機構は未だ明らかになっていない。Snf1 AMPK の下流因子の一つとして、Target Of Rapamycin Complex 1 (TORC1) が知られている。TORC1 は Rapamycin 感受性のプロテインキナーゼであり、栄養状態や種々のストレスに応答して細胞成長を制御する因子である。これまでに、グルコース飢餓状態では、Snf1 AMPK が TORC1 活性を抑制することが報告されている^[3]。そこで本研究では、小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK の下流で TORC1 が Ire1-Hac1 経路を制御するか検討した。

方法

1. サンプルング

菌株を YPD 培地に植菌し、一晚前培養した。OD を計測し、菌体量を調整して新たな YPD 培地 60 ml に植菌し、4 時間本培養した。Dithiothreitol (DTT: 小胞体ストレスを誘導する薬剤) 添加直前を 0 時間としてサンプルングし、最終濃度 4 μ M となるように DTT を添加して、その後 1.5 時間毎に 7.5 時間までサンプルングした。

2. Ire1-Hac1 経路の活性解析

HAC1 mRNA スプライシングレベルを指標とし、Ire1-Hac1 経路の活性を解析した。サンプルングした菌体について、Isogen、RNeasy を用いて、RNA を抽出、精製した。各サンプルの RNA 濃度を測定して 100 ng/ μ l に希釈し、逆転写反応で cDNA を合成した。イントロンを挟むように設定したプライマーを用いて、PCR 反応で *HAC1* 領域を増幅したのち、アガロースゲル電気泳動した。LAS-4000 による画像解析で、増幅した *HAC1* 断片を検出し、*HAC1* mRNA スプライシングレベルを定量した。

3. Sfp1 細胞内局在の観察

YPD 培地で本培養し、サンプルングした菌体を SD 培地で洗ったのち、蛍光顕微鏡で GFP 蛍光を観察した。

結果

1. TORC と Sfp1 は Ire1-Hac1 経路を正に制御する

野生株で小胞体ストレスを誘導すると、Ire1-Hac1 経路の活性は上昇し、誘導後 1.5~3 時間をピークに徐々に低下する。野生株に TORC1 活性の阻害にはたらく Rapamycin を処理すると、Ire1-Hac1 経路の活性は Rapamycin を処理しない場合と比較して急速に低下した。また、TORC1 の構成因子である Tor1 ないし Tco89 をコードする遺伝子の破壊株においても、Rapamycin 処理と同様の結果がみられた。したがって、TORC1 が Ire1-Hac1 経路を正に制御することが示唆された。

次に、TORC1 の下流因子の同定を試みた。TORC1 の標的因子の一つとして知られる Sfp1 タンパク質は、リボソームタンパク質の発現やリボソーム生合成を制御する転写因子である。Sfp1 は TORC1 にリン酸化されることで核に移行し、脱リン酸化されると核外に移行する^[4]。そこで、*sfp1* 破壊株において小胞体ストレスを誘導したところ、Ire1-Hac1 経路の活性は野生株と比較して急速に低下した。したがって、Sfp1 が TORC1 の下流で Ire1-Hac1 経路を正に制御することが示唆された。

2. Snf1 AMPK は Sfp1 核移行を負に制御する

続いて、小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK と TORC1 が Sfp1 を制御しているか検討するため、C 末端に GFP タグを挿入した内在 *SFP1* (*SFP1-GFP*) を有する株で、Sfp1 の細胞内局在を観察した。小胞体ストレスのない状態では、Sfp1 は核に局在していた。それに対して小胞体ストレスを誘導すると、先行研究の通り^[4]、Sfp1 は核外に移行した。次いで、Sfp1 局在に対する Snf1 AMPK の効果を検討した。Snf1 活性型株である *reg1* 破壊株では、Rapamycin 処理した場合と同様に、Sfp1 は小胞体ストレス誘導前から核外に局在した。このことから、Snf1 AMPK は TORC1 活性を阻害することで、Sfp1 核移行を負に制御することが示唆された。

考察

小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK の下流で TORC1 と Sfp1 が機能することが示唆された。TORC1 は Sfp1 を介して Ire1-Hac1 経路を活性化し、Snf1 AMPK は TORC1 活性を抑制して Ire1-Hac1 経路を負に制御することが推測される。

参考文献

- [1] P. Walter and D. Ron, *Science* 334, 1081-1086 (2012)
- [2] T. Mizuno *et al.*, *PLoS Genet.* 11, e1005491 (2015)
- [3] J. E. Hughes Hallett *et al.*, *eLife* 4, e09181 (2015)
- [4] H. Lempiainen *et al.*, *Mol. Cell* 33, 704-716 (2009)
- [5] R. M. Marion *et al.*, *PNAS* 101, 14315-14322 (2004)