

# Artemis は AMP-activated protein kinase (AMPK) の 活性化因子として機能する

## 学位論文内容の要旨

### 【目的と背景】

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内 AMP/ATP 比の上昇により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼで、細胞内のエネルギーセンサーとして機能することが知られている。AMPK は、低酸素、低グルコース、低 pH などの細胞ストレス、或いはサイトカイン刺激により活性化が誘導され、糖、脂質代謝を制御することで細胞のエネルギー消費を抑制する。また、腫瘍組織における低酸素状態の結果生じる低エネルギー適応応答においても HIF-1 とは独立して機能し、腫瘍増殖に必須であることが報告されている。このように AMPK シグナルが癌細胞の生存維持と腫瘍の発達に深く関わっていることが明らかになっているものの、AMPK 自体の活性を制御する機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、AMPK シグナルの制御機構を解析する目的で Yeast two-hybrid system を用いて AMPK $\alpha$ 2 に結合するタンパク質の網羅的検索を行い、新規結合タンパク質として Artemis を同定した。Artemis は DNA 二重鎖切断修復経路である非相同末端結合修復 (non-homologous end-joining : NHEJ) において DNA-PK、Ku80/70 と協調して働く因子として同定された遺伝子で、ATM によるリン酸化制御を受けていると報告されている。一方、Cdk1-cyclinB の制御を介して G2/M cell cycle checkpoint recovery の制御を行っているとの報告もされており、DNA 修復以外にも多様な機能を有していると考えられる。本研究では、Artemis の AMPK の機能制御における役割について検討した。

### 【材料と方法】

Yeast two-hybrid 法にて AMPK $\alpha$ 2 の新規結合タンパク質の検索を行い、Artemis を同定した。次に、ヒト骨肉種 U2OS 細胞への遺伝子導入系を用いて、免疫沈降およびウエスタンブロッティングを行い、細胞内における Artemis と AMPK の結合性の確認と AMPK 活性化剤 (AICAR) 添加が Artemis-AMPK 結合へ及ぼす影響の検討をした。さらに、Artemis の欠失変異体を用いて AMPK 結合ドメインの同定を行った。また、免疫蛍光染色を行い Artemis と AMPK の細胞内局在性を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。次に、U2OS 細胞およびヒト胎児腎臓 HEK-293 細胞での Artemis の過剰発現系、ならびに siRNA を用いた U2OS 細胞での Artemis 発現抑制系において、AMPK およびその下流のシグナル伝達の活性化状態を、リン酸化状態特異的な AMPK 抗体、ACC 抗体および S6K 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。また、免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより、AMPK の上流キナーゼである LKB1 と AMPK および Artemis の結合性の検討と、Artemis における LKB1 結合ドメインの決定を行った。

## 【結果】

1 Yeast two-hybrid スクリーニングの結果、AMPK $\alpha$ 2 の新規結合タンパク質として Artemis を同定した。また、U2OS 細胞にて Artemis と AMPK の物理的結合を確認し、さらに、両者の結合は AICAR 刺激により弱まる傾向が認められた。2 Artemis における AMPK の結合部位は、1-150aa の領域と 151-402aa の領域であることが判明した。3 免疫蛍光染色により AMPK と Artemis の核内での共局在を確認した。4 U2OS 細胞において Artemis の導入により、AMPK の活性化を示す Thr172 のリン酸化亢進、及び AMPK により直接リン酸化される ACC の Ser79 のリン酸化亢進と、mTOR シグナルを介して AMPK により抑制される S6K の Thr389 のリン酸化低下を認めた。また HEK-293 細胞においても Artemis の導入量依存的に AMPK の Thr172 のリン酸化亢進を認めた。5 Artemis、AMPK、LKB1 の三者を共導入した条件下では Artemis、AMPK ともに LKB1 との結合量の増加を認め、また、Artemis における LKB1 の結合部位は 1-150aa の領域であることが判明した。6 Artemis siRNA の導入により AMPK の Thr172 のリン酸化低下及び ACC の Ser79 リン酸化低下、S6K の Thr389 リン酸化亢進を認めた。

## 【考察】

本研究より、AMPK $\alpha$ 2 の新規結合タンパク質として核内タンパク質である Artemis を同定し、さらに Artemis が AMPK および AMPK の上流キナーゼである LKB1 と複合体を形成していることを示した。ストレス応答時には AMPK の核移行が増えること、LKB1 も、STRAD、MO25 と結合していない状態では核内に存在していることが報告されており、本研究の結果を考え合わせると、ストレス条件下では核内で Artemis-AMPK $\alpha$ -LKB1 の複合体が形成され、AMPK の活性化を誘導する可能性が示唆される。また、LKB1 と AMPK の結合は Artemis により増強される結果から、Artemis は LKB1 $\rightarrow$ AMPK のシグナル伝達において足場タンパク質 (scaffold protein) として機能することが予想される。

本研究では Artemis が AMPK $\alpha$  の Thr172 のリン酸化を促進することで、AMPK の下流シグナルの制御に関与することを示した。腫瘍細胞における AMPK の活性化は細胞増殖や代謝活動を制御することで、限られた酸素、栄養下におけるエネルギー消費を低下させ、最終的には腫瘍の微小環境での異化、同化のバランスを保ち腫瘍細胞の生存維持に関与していると考えられる。AMPK は低グルコース適応応答時に TSC2 をリン酸化して mTOR シグナルを抑制し細胞増殖を負に制御していることが知られているが、本研究においても U2OS 細胞での過剰発現実験およびノックダウン実験の結果から、Artemis による AMPK の活性化は mTOR シグナルを抑制していることが示されており、Artemis は AMPK の活性制御を介して低グルコースなどの細胞ストレスに対する適応応答を促進していると思われる。

今後、本研究で得られた知見を基に更に詳細な解析を行うことで、Artemis-AMPK シグナルの分子レベルの理解が深まるだけでなく、腫瘍細胞における Artemis の遺伝子変異と治療抵抗性との相関性など、臨床にも応用可能な知見をもたらすことができると考えている。

## 【結語】

1 AMPK $\alpha$ 2 と結合する新規タンパク質として Artemis を同定した。  
2 Artemis は AMPK $\alpha$ 2 のリン酸化の促進を介して、AMPK のストレス適応応答時のシグナル伝達の制御に関連していることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

## Artemis は AMP-activated protein kinase (AMPK) の 活性化因子として機能する

AMPK は細胞内 AMP/ATP 比の上昇により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼで、細胞内のエネルギーセンサーとして機能している。また、腫瘍組織における低酸素状態の結果生じる低エネルギー適応応答においても、腫瘍増殖に必須であることが報告されている。本研究では、AMPK シグナルの制御機構を解析する目的で Yeast two-hybrid system を用いて AMPK  $\alpha 2$  に結合するたんぱく質の網羅的検索を行い、新規結合たんぱく質として Artemis を同定した。Artemis は重症複合免疫不全症の原因遺伝子として同定されたもので、DNA 二重鎖切断修復経路である非相同末端結合修復、V(D)J recombination、G2/M cell cycle checkpoint recovery の制御に関与していると報告されている。

本研究では、U2OS 細胞を用い Artemis と AMPK の物理的結合を確認し、免疫蛍光染色法により核内での共局在を確認した。

また、Artemis により AMPK  $\alpha 2$  のリン酸化が促進されることを示し、Artemis が AMPK のリン酸化を介して ACC を介した脂肪酸代謝や mTOR を介した腫瘍増殖の制御など AMPK シグナル伝達の制御に関与している事を明らかにした。さらに、Artemis、AMPK、LKB1 の三者を導入した条件下では AMPK と LKB1 との結合量の増加を認め、Artemis が LKB1 と AMPK の結合の安定化および AMPK のリン酸化促進に関与している可能性が示唆された。

公開発表では、学位論文内容発表の後、副査畠山鎮次教授より、Artemis はホモダイマーを形成するかどうか、Artemis、AMPK、LKB の 3 量体モデルの解釈について、及び今後どのような細胞生物学的実験を予定するかについての質問があった。申請者はそれに対し、Artemis は DNA-PK、ATM の基質となるが、アイソフォーム等の報告はないことを述べ、3 量体モデルについては、本実験では 3 者それぞれの結合について確認しており、Artemis が足場たんぱく質として働くことでシグナル伝達の際に Artemis 上で AMPK、LKB1 が隣り合うように結合し、LKB1 による AMPK のリン酸化を促進しているのではないかと述べた。また、今後の実験の予定については、AMPK の mTOR シグナルや p53 を介したアポトーシスの制御に与える Artemis の影響について、細胞増殖アッセイやカスパーゼアッセイを用いて検討したいと述べた。

次いで副査今村雅寛教授より、今回は主に骨肉腫細胞を用いて実験を行っているが、他のがん細胞や正常細胞でも同じような結果が得られるかどうか、およびストレス環境下で

HIF-1 と今回の分子の関係についての質問があった。申請者はそれに対し、他のがん細胞においても AMPK による mTOR の抑制は報告されており、Artemis が関与している可能性が十分であると推測されること、正常細胞については、本研究において HEK-293 細胞で Artemis による内在性 AMPK のリン酸化の促進を確認しており、今後追加実験をして検討したいと述べた。また種の存続のため、ストレス環境下における代謝に関与した経路が複数あることで、安全弁のようになっているのではないかと述べた。

最後に主査浅香正博教授より、低酸素、低栄養で Artemis 遺伝子の発現亢進はみられるかどうかの質問があり、今後 Artemis を抑制する事で AMPK 系を介して腫瘍増殖抑制が生じれば興味深いとの話があった。申請者はそれに対し、低酸素、低栄養について遺伝子発現の亢進については検討しておらず、今後検討を行いたいと述べた。

この論文は、AMPK に結合する新規たんぱく質 Artemis を同定し、Artemis が AMPK のリン酸化を介し、下流シグナル伝達の制御に関っていることを初めて示したもので、更に詳細な解析を行うことで、Artemis-AMPK シグナルの分子レベルの理解が深まるだけでなく、臨床応用可能な知見をもたらす可能性を示唆したものであり、今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。