

エンドソーム結合性プロテインキナーゼLMTK1による Rab11 活性制御と神経機能

高橋 美由紀^{1,†}, 友村 美根子², 久永 眞市^{1,3}

1. はじめに

LMTK1は脳で高発現するエンドソーム結合性のSer/Thrキナーゼである。当初は骨髄前駆細胞のアポトーシス時に発現誘導される因子として分離された¹⁾。マウスLMTK1Aはアミノ酸数が1317の大きな分子である(SDS-PAGEでの見かけの分子量は約25万)(図1A)。N末端側にプロテインキナーゼに共通した配列があり、長いC末端尾部が続く。キナーゼ領域の配列が受容体型チロシンキナーゼに最も似ていたため、apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK)と命名された¹⁾。しかし、発現はアポトーシス時とは限らず、キナーゼ活性はSer/Thrと判明した。そこで、分子の構造から、長い尾を持つキツネザルにちなんで、lemur tail kinase 1 (LMTK1)と改名されている²⁾。我々は、Cdk5活性化サブユニットp35に結合するタンパク質として分離し³⁾、その機能について解析を行ってきた。最近、Rab11依存性リサイクリングエンドソームに結合し、その輸送を介して神経細胞の軸索、樹状突起やスパインの形成に関わることなどがわかってきた。本稿では、

我々の研究結果を中心にLMTK1の性質と神経機能についてまとめる。

2. LMTK1の遺伝子と発現調節

遺伝子名はまだである。ヒト遺伝子は染色体17q25.3に、マウス遺伝子は染色体11;11E2に存在する。遺伝子には15個のエクソンがあり、転写産物も複数と予測されている。マウスでは少なくとも二つのアイソフォーム、LMTK1AとLMTK1B、がタンパク質レベルで検出されている⁴⁾。両者はN末端の膜貫通領域の有無で区別される。LMTK1BはLMTK1AのN末端に二つの膜貫通配列(TM)が付加したものである(図1A)。一方、ヒトでは一つの膜貫通領域を持つLMTK1BタイプがNCBIのデータベース(NP_001073864.2)に載っているのみである。遺伝子のイントロンから転写されるmicroRNA miR-338は、がんとの関連が示唆されている。

LMTK1は多くの末梢組織でも発現しているが、特に脳で高く発現する⁵⁾。大脳皮質、海馬、小脳などほとんどの領域で発現し、神経分化とともに発現は増加する。マウス脳では二つのアイソフォームが同レベルで発現し、両者とも脳の発達とともに増加する⁶⁾。(以下で述べる大部分はLMTK1Aで得られた結果である。LMTK1AとLMTK1Bの共通した性質はLMTK1と表記している。)

3. LMTK1の生化学的、細胞生物学的性質

LMTK1はプロテインキナーゼに分類されているが、その活性は弱く、基質はわかっていない。キナーゼ領域のアミノ酸配列はBDNF/NT3受容体チロシンキナーゼと高い相同性(約38%)を示すが、Ser/Thrキナーゼである。LMTK1の活性は自己リン酸化でしか示されていないが⁷⁾、LMTK2(LMTK1~3ファミリーの一つ)がSer/Thrキナーゼ活性を示すことから、LMTK1もそうであろうと考えられている。一方、LMTK1Aのキナーゼ領域に存在するキナーゼに共通したアミノ酸の変異体(たとえばAsn206Val)はドミナントネガティブ効果を示すことから、キナーゼ活性は機能に重要であると考えられる。また、LMTK1A活性はCdk5-p35によるSer34のリン酸化で活

¹ 東京都立大学 (〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1)

² 明海大学 (〒279-8550 千葉県浦安市明海一丁目)

³ 東京都臨床医学総合研究所 (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2-1-6)

LMTK1, endosome-associated Ser/Thr kinase regulating Rab11-dependent endosomal trafficking in neurons

Miyuki Takahashi^{1,†}, Mineko Tomomura² and Shin-ichi Hisanaga^{1,3} (¹Laboratory of Molecular Neuroscience, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minamiosawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan, ²Department of Oral Health Sciences, Meikai University School of Health Sciences, 1-chome Meikai, Urayasu, Chiba 279-8550, Japan, ³Department of Dementia and Higher Brain Function, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya, Tokyo 156-8506, Japan)

[†] 現所属: 早稲田大学理工学術院先進理工学部生命医科学科 (〒162-0056 東京都新宿区若松町2-2 TWIns 02C203) [Present address: Department of Life Science and Medical Bio-Science, Waseda University, TWIns 02C203, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0056, Japan]

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930765

© 2021 公益社団法人日本生化学会

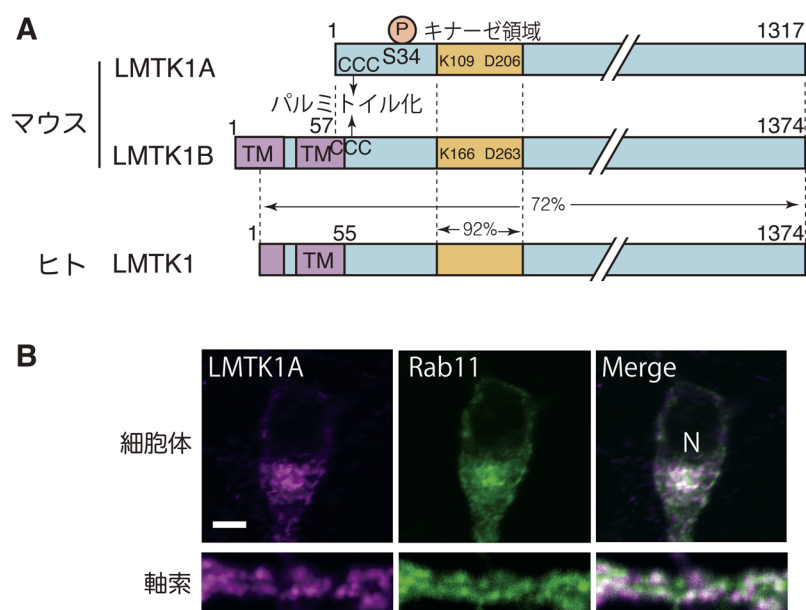


図1 LMTK1分子の構造と細胞内局在

(A) マウスのLMTK1AとLMTK1B, およびヒトのLMTK1. LMTK1AとLMTK1Bは選択的スプライシングによるアイソフォームで, N末端の膜貫通配列 (TM) が異なる. キナーゼ領域には, 活性に必須のアミノ酸Lys(K)とAsp(D)が保存されている. LMTK1AはN末端三つのシステイン (ccc) のパルミトイル化により膜に結合する. Ser34はCdk5-p35によるリン酸化部位である. ヒトLMTK1は一つの膜貫通配列を持つタイプのみが報告されている. (B) 神経細胞におけるLMTK1AのRab11陽性エンドソームへの局在. 神経細胞の細胞体(上)と軸索(下)におけるLMTK1A(左)とRab11 (中央) の局在. 右は共局在. スケールバー, 5 μ m.

性化される⁸⁾. キナーゼ活性の検出とその制御, 基質の同定は今後の課題である.

LMTK1のC末端尾部領域は足場タンパク質としての働きが示唆されている. Cdk5活性化サブユニットp35は, キナーゼ領域のすぐC末端で結合する³⁾. プロリンリッチキナーゼ (SAPK) やプロテインホスファターゼ1 (PP1) の結合も報告されている²⁾.

LMTK1AはN末端のシステイン残基 (Cys4, 6, 7) のパルミトイル化により膜に結合する表在性タンパク質である (図1A). パルミトイル基の数によって膜への結合が強くなる. 細胞内では三つともパルミトイル化されているようである. 野生型LMTK1Aを培養細胞に発現させると核周囲でRab11と共局在する (図1B). すなわち, リサイクリングエンドソームに結合している. CHO-K1細胞では, リサイクリングエンドソームが核近傍と中心体周辺とに分離するが, LMTK1Aは主に中心体周辺のエンドソームに存在している. パルミトイル化はLMTK1Aのエンドソーム局在には必須である⁹⁾.

エンドサイトーシスされた細胞膜受容体などは, 分解や再利用などの目的に応じて, 異なるエンドソームを経て輸送されていく. 各エンドソームの輸送はRab低分子量Gタンパク質群によって制御されている. Rabの活性は結合しているグアニンヌクレオチドによって決まる. GTPが

結合すると活性型となり, GDPは不活性型である. GDPが結合した不活性型はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によってGTPが結合した活性型となり, GTPase活性化タンパク質 (GAP) によって不活性化される. リサイクリングエンドソームの輸送を制御するRab11はよく研究されているにもかかわらず, その活性調節因子については意外とわかっていない. LMTK1Aは新規なRab11の上流因子である.

LMTK1AはRab11陽性エンドソームに局在するが, Rab11を直接には制御しない. Rab11のGEFまたはGAPを介して制御していると思われた. Rab11のGEFやGAPが同定されてきたのは比較的最近である. LMTK1Aとそれらの相互作用を検討したところ, Rab11 GAPのTBC1D9Bが同定された. TBC1D9Bは, Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) 領域を持つタンパク質である¹⁰⁾. TBC1D9Bが神経細胞で発現し, スパイン形成においてLMTK1活性に依存してRab11を不活性化することを実際に確認している¹¹⁾.

以上を元に, エンドソーム膜上でのLMTK1によるRab11活性の制御カスケードを描くと図2A左となる. LMTK1を活性化するCdk5はその活性化サブユニットp35のN末端パルミトイル化を介して小胞に結合している. Cdk5ではp25による異常活性化が知られているが, p25はN末端側が切断されて, 膜から遊離された異常活性型であ

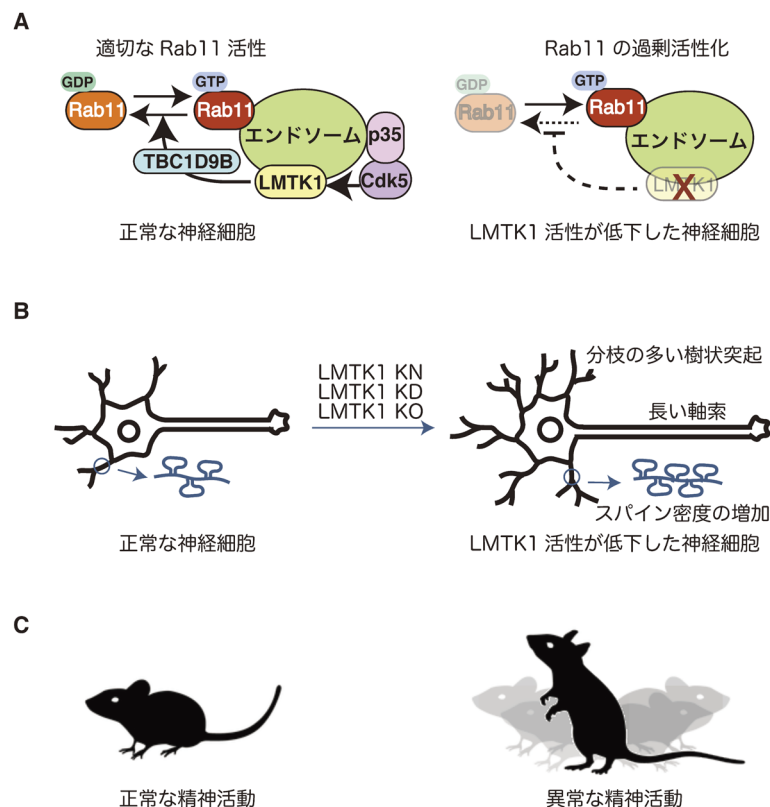


図2 LMTK1によるRab11活性の調節と神経機能

(A)はエンドソーム輸送を制御するCdk5-LMTK1A-TBC1D9B-Rab11カスケード。LMTK1はCdk5-p35によるリン酸化で活性化され、TBC1D9Bを活性化してRab11を不活性化する。LMTK1の欠損はRab11の過剰活性化を引き起こす。(B)は細胞、(C)は個体レベルにおける神経機能。(B) LMTK1の活性低下〔不活性型 (KN) LMTK1, LMTK1ノックダウン (KD), ノックアウト (KO)〕は、Rab11Aの過剰活性化を引き起こす。細胞レベルでは軸索の異常伸長、樹状突起分枝の増加、スパイン密度の増加となる。(C) LMTK1KOマウス (右図) では、野生型マウス (左図) に比べ多動・衝動的行動が増加し、不安・うつ様行動の低下がみられた。

る。LMTK1はCdk5-p35の生理的な基質であり、両者の結合した小胞どうしが近接または融合したとき、LMTK1はリン酸化され活性化されると考えている。一方、LMTK1のターゲットであるTBC1D9Bの膜との関連はまだわかっていないが、その下流であるRab11はC末端システインのゲラニルゲラニル化を介してリサイクリングエンドソームに結合している。このように輸送される膜上で、輸送制御系のシグナルカスケードが機能しているのは合理的である。一方、異なる脂質修飾による膜結合がどのように同じ膜上にリクルートされているのかは興味深い点である。

LMTK1Bは二つの膜貫通配列をN末端に持つ膜内在性タンパク質である (図1A)。野生型LMTK1Bを培養細胞で発現させるとLMTK1Aと同じく、中心体周辺のエンドソームに集積する⁶⁾。膜貫通配列直後の三つのシステイン (Cys61, 63, 64) もパルミトイル化が予想されている (図1A)。LMTK1Bはシグナル配列を持ち、小胞体上で合成され、ゴルジ体を経由して、エンドソームに集積すると考えられる。不活性型LMTK1Bを培養細胞に発現させると、小胞体からゴルジ体への輸送が阻害され、不活性型

LMTK1Bは小胞体-ゴルジ体中間区画に蓄積する。小胞体の細胞内分布も変化することから、LMTK1Bは小胞体からゴルジ体への輸送にも関わっていると考えられる⁶⁾。

4. LMTK1の神経突起形成における役割と神経機能

神経細胞は軸索、樹状突起という2種類の突起を持つ極性のある細胞形態をしている。神経細胞でもRab11とリサイクリングエンドソームはエンドサイトーシスされた受容体の再利用に関与すると考えられる。たとえば、軸索末端での神経伝達物質の分泌回収や、樹状突起スパインでの受容体の取り込みなどである。しかし、実際にわかっていることは少ない。神経細胞でもRab11の大部分は核近傍に集積しており (図1B)、細胞体から軸索や樹状突起の先端に向けての膜成分 (脂質や膜タンパク質) の供給にも関わっていると考えられる (図1B)¹²⁾。

初代培養神経細胞は、LMTK1およびRab11の神経突起形成における役割を解析するに優れた実験系である。マウス14~16日胚から神経細胞を取り出し、培養すると3~5

日目で軸索が伸長し、その後に樹状突起が形成され、2週間以上の培養でスパイン（シナプス）が観察されるようになる。野生型 LMTK1A を過剰発現させても軸索の伸長、樹状突起やスパインの形成に変化はみられない。しかし、不活性型 LMTK1A を発現させると、軸索は長くなり、樹状突起が過形成され、成熟型スパインの密度が増加する。LMTK1 をノックダウン（KD）しても、LMTK1 ノックアウト（KO）神経細胞でも同様の現象が観察される¹¹⁻¹³。すなわち、LMTK1 は神経細胞の突起（軸索、樹状突起、スパイン）の形成を負に制御する因子である（図2B）。

Rab11 依存性エンドソームは軸索と樹状突起内の微小管上を順行性（末端方向）と逆行性（細胞体方向）の両方向性に移動する。軸索ではすべての微小管は遠位側がプラス端（重合しやすい端）である。LMTK1 KO 神経細胞では順行性の割合が増加し、軸索末端への膜の供給が増加する¹³。移動するエンドソームを詳しく観察すると、移動速度と移動距離が LMTK1 KO で増加していた。樹状突起では方向性の異なる微小管が混在し、Rab11 陽性エンドソームは移動方向を頻繁に変換していた。LMTK1 KO では末端への動きが増加しており、膜の供給過剰から樹状突起の過形成になったと考えられる¹³。

突起先端に膜成分が供給されるためには、エンドソームが細胞膜と融合する必要がある。軸索や樹状突起の先端は成長円錐と呼ばれるアクチンフィラメントに富んだ構造をしている。Rab11 は突起のシャフト内で微小管に沿ったりサイクリングエンドソームの移動を制御するが、成長円錐では Rab とエンドソームの輸送システムの変換が起こっている。LMTK1A はこれにも関与しているようである。成長円錐に入る際に LMTK1A は活性化型から不活性型に変換されるようである。不活性型 LMTK1A は主にアクチンが豊富な細胞膜近傍に局在し¹⁴、LMTK1 KO 神経細胞では、成長円錐に入るエンドソームの数が増加する¹⁰。スパインでも同様なことが観察される¹³。

LMTK1 が突起過形成の抑制因子であれば、LMTK1 の KO マウス脳では軸索、樹状突起、スパインなどの過形成による神経系の構造および機能の異常がみられるはずである。しかし、KO マウスは誕生し、成長し、脳構造にも著しい異常はみられない¹³。大脳皮質でのシナプス数は増加していたが^{11, 15}、それを反映するようなシナプスの電気生理的な反応も記録されない。しかし、KO マウスの行動解析ではいくつかの異常が観察された¹⁵。オープンフィールドでの運動量や壁面への立ち上がりの回数が増加し、注意欠陥多動性障害の治療薬メチルフェニデートで野生型と同レベルまで低下した。高架十字テストや尾懸垂テスト、強制水泳テストでは不安様行動が低下しており、衝動性や多動性と合わせて、精神活動との関連が示唆された（図2C）。

5. おわりに

LMTK1 が見つかったから20年以上が経過したが¹⁾、いまだ謎だらけである。LMTK1 のキナーゼ活性を検出できないため、基質もわからない。直接のターゲットとして TBC1D9B Rab11 GAP が同定されたが、調節機構は不明である。LMTK1 の活性低下はエンドソーム輸送を促進するが、その過剰発現の影響はみられない。LMTK1 は過剰成長の防止にのみ役割を果たしているようである。遺伝子欠損は精神活動に影響を与えていそうであるが、ヒトの LMTK1 についてはまったく調べられていない。しかし（だからこそ）、神経細胞の小胞輸送におけるネガティブモデュレーターとして面白い因子である。研究はまだ初期で、ここからの参入も遅くはない。本小稿で少しでも興味を持ってくれる方が増えればと願っている。

謝辞

これまで当研究室で LMTK1 研究を行ってきた竹下亘、本間直幸、堤弘次、高野哲也、Govinda Sharma、西野尋紀、魏冉の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Gaozza, E., Baker, S.J., Vora, R.K., & Reddy, E.P. (1997) AATYK: A novel tyrosine kinase induced during growth arrest and apoptosis of myeloid cells. *Oncogene*, **15**, 3127-3135.
- 2) Hisanaga, S., Wei, R., Huo, A., & Tomomura, M. (2020) LMTK1, a novel modulator of endosomal trafficking in neurons. *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 112.
- 3) Honma, N., Asada, A., Takeshita, S., Enomoto, M., Yamakawa, E., Tsutsumi, K., Saito, T., Satoh, T., Itoh, H., Kazi, Y., et al. (2003) Apoptosis-associated tyrosine kinase is a Cdk5 activator p35 binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 398-404.
- 4) Tomomura, M., Fernandez-Gonzales, A., Yano, R., & Yuzaki, M. (2001) Characterization of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) expressed in the CNS. *Oncogene*, **20**, 1022-1032.
- 5) Tomomura, M., Morita, N., Yoshikawa, F., Konishi, A., Akiyama, H., Furuichi, T., & Kamiguchi, T. (2007) Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) family. *Neuroscience*, **148**, 510-521.
- 6) Wei, R., Sugiyama, A., Sato, Y., Nozumi, M., Nishino, H., Takahashi, M., Saito, T., Ando, K., Fukuda, M., Tomomura, M., et al. (2020) Isoform-dependent subcellular localization of LMTK1A and LMTK1B and their roles in axon outgrowth and spine formation. *J. Biochem.*, **168**, 23-32.
- 7) Kawa, S., Fujimoto, J., Tezuka, T., Nakazawa, T., & Yamamoto, T. (2004) Involvement of BREK, a serine/threonine kinase enriched in brain, in NGF signalling. *Genes Cells*, **9**, 219-232.
- 8) Tsutsumi, K., Takano, T., Endo, R., Fukuda, M., Ohshima, T., Tomomura, M., & Hisanaga, S. (2010) Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS One*, **5**, e10260.

- 9) Tsutsumi, K., Tomomura, M., Furuichi, T., & Hisanaga, S. (2008) Palmitoylation-dependent endosomal localization of AATYK1A and its interaction with Src. *Genes Cells*, **13**, 949–964.
- 10) Fukuda, M. (2011) TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci. Rep.*, **31**, 159–168.
- 11) Takano, T., Tomomura, M., Yoshioka, N., Tsutsumi, K., Terasawa, Y., Saito, T., Kawano, H., Kamiguchi, H., Fukuda, M., & Hisanaga, S. (2012) LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. *J. Neurosci.*, **32**, 6587–6599.
- 12) Takano, T., Urushibara, T., Yoshioka, N., Saito, T., Fukuda, M., Tomomura, M., & Hisanaga, S. (2014) LMTK1 regulates dendritic formation by regulating movement of Rab11A-positive endosomes. *Mol. Biol. Cell*, **25**, 1755–1768.
- 13) Nishino, H., Saito, T., Wei, R., Takano, T., Tsutsumi, K., Taniguchi, M., Ando, K., Tomomura, H., Fukuda, M., & Hisanaga, S. (2019) The LMTK1-TBC1D9B-Rab11A cascade regulates dendritic spine formation via endosome trafficking. *J. Neurosci.*, **39**, 9491–9502.
- 14) Sharma, G., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Ando, K., Tomomura, M., & Hisanaga, S. (2016) Kinase activity of endosomal kinase LMTK1A regulates its cellular localization and interactions with cytoskeletons. *Genes Cells*, **21**, 1080–1094.
- 15) Takahashi, M., Sugiyama, A., Wei, R., Kobayashi, S., Fukuda, K., Nishino, H., Takahashi, R., Tsutsumi, K., Kita, I., Ando, K., et al. (2020) Hyperactive and impulsive behaviors of LMTK1 knockout mice. *Sci. Rep.*, **10**, 15461.

著者寸描

●高橋 美由紀 (たかはし みゆき)



早稲田大学理工学術院先進理工学部生命医科学科助教。博士（理学）。

■略歴 2013年東京都立大学（首都大学東京）都市教養学部卒業。15年同大学院理工学研究科修士課程修了。19年同大学院理工学研究科博士課程修了。同年4月より現職。

■研究テーマと抱負 記憶・学習や情動などの高次脳機能のメカニズムの解明を

目指す。とても複雑で未解明なことばかりの脳について、一つでも多くの事象解明に貢献していきたい。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/-miyu->

■趣味 動物を愛でること。小さい頃から様々な動物たちに囲まれた生活を送っています。現在は、フクロモモンガの繁殖とカクレクマノミの稚魚の生育に夢中です。