

ROCOファミリーキナーゼLRRK1の基質依存的な細胞機能

花房 洋, 松本 邦弘

1. はじめに

ROCOファミリーキナーゼLRRK1は、Ras様GTPaseドメインとMAPKKK様キナーゼドメインを持つ、250kDaの巨大なキナーゼである(図1)。LRRK1のファミリー分子LRRK2は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つ(Park8)であることから臨床的にも注目されている。しかし、LRRK1、LRRK2の機能に関してはいまだ不明な点が多い。LRRK1、LRRK2の機能解明が遅れている理由の一つは、生理的に重要な標的タンパク質(基質)が未同定なためである。我々はLRRK1と相互作用する分子の中から、機能がLRRK1によるリン酸化で制御される分子をいくつか同定することに成功した。それらの分子の解析から、LRRK1は間期において上皮成長因子受容体(EGFR)の細胞内輸送に機能し¹⁻³⁾、細胞分裂(M)期には中心体からの星状体微小管形成を介した紡錘体配向制御に重要なこと⁴⁾を明らかにした。このように、LRRK1は基質に依存して異なる細胞機能を制御していることが明らかとなった。本稿では、最近明らかにした(1)LRRK1によるCLIP-170のリン酸化を介したEGFR細胞内輸送制御と、(2)CDK5RAP2のリン酸化を介したM期紡錘体配向制御、について紹介する。

2. LRRK1はCLIP-170をリン酸化し、EGFR細胞内輸送の開始を制御する

EGFRは細胞膜上でEGFによって活性化されると、MAPキナーゼ経路など下流シグナル伝達経路を活性化する。このとき、活性化したEGFRはクラスリン依存的またはクラスリン非依存的な経路によって細胞内に取り込まれ、初期エンドソーム、多胞体(multivesicular body: MVB)/後期

エンドソームを経てリソソームに送られ分解される。この過程は、EGFRシグナルのダウンレギュレーションに重要である。これまでに我々は、LRRK1がキナーゼ活性依存的にEGFR細胞内輸送を制御していることを明らかにしてきた^{1,2)}。LRRK1をノックダウンした細胞では、EGFRを含むエンドソームの輸送・成熟が阻害され、EGFRは初期エンドソームに蓄積してしまう。一方、恒常的に活性化したLRRK1を発現した細胞では、EGFRを含むエンドソームの輸送が過剰に生じ、核付近に未成熟な肥大化したエンドソーム(初期エンドソームと後期エンドソームの性質を併せ持つエンドソーム)が形成される。このように、LRRK1はキナーゼ活性依存的にEGFRを含むエンドソームの輸送・成熟に機能していることが明らかとなった。

しかし、EGFR細胞内輸送におけるLRRK1の基質については不明であった。最近我々は、微小管プラス端結合因子(plus-end tracking protein: +TIP) CLIP-170が、LRRK1の基質であることを見いだした³⁾。もともと、CLIP-170はエンドソームと微小管をつなぐ分子(リンカー)として同定されていたが、リンカーとしての機能の詳細は不明なままであった⁵⁾。その後、CLIP-170は微小管の先端(プラス端)に局在することが明らかとなり、最初の+TIPとして再同定された。さらに、微小管プラス端に局在したCLIP-170は、ダイナクチン複合体構成因子p150^{Glued}を微小管先端にリクルートするのに重要な役割を担っていることが明らかとなった⁶⁾。ダイナクチンはダイニンと複合体を形成し、ダイニンによる積荷の輸送に重要な働きをしている。CLIP-170は、ダイニン・ダイナクチン複合体を微小

ROCOファミリーキナーゼ

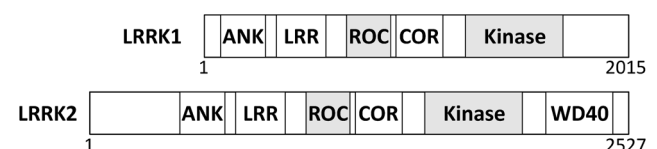


図1 LRRK1およびLRRK2の構造

LRRK1、LRRK2はROCOファミリーキナーゼに属し、Rasに似たGTPaseドメイン(ROC)やMAPKKKに似たキナーゼドメインなどを持つ約250kDaの巨大なキナーゼである。ANK: アンキリンリピート, LRR: ロイシンリッチリピート, ROC: Ras of complex proteins, COR: C-terminal of ROC, kinase: キナーゼドメイン。

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻(〒464-8602 愛知県名古屋市中種区不老町)

Regulation of cellular function by ROCO family kinase LRRK1 in a manner dependent on its substrates

Hiroshi Hanafusa and Kunihiro Matsumoto (Department of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890286

© 2017 公益社団法人日本生化学会

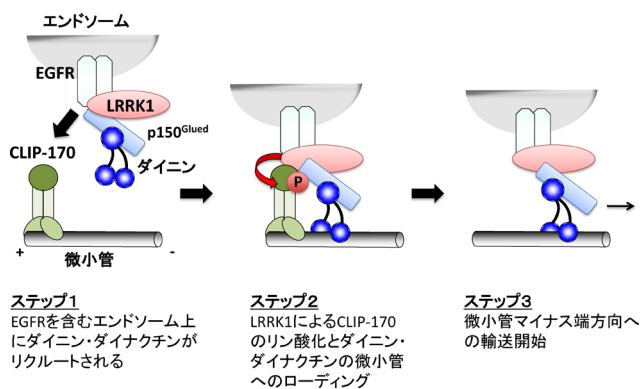


図2 EGFRを含むエンドソームの輸送におけるLRRK1の機能活性化したEGFRおよびLRRK1, ダイニン・ダイナクチンはエンドソーム膜上で複合体を形成し存在する。LRRK1が伸長してきた微小管の先端に局在するCLIP-170をリン酸化すると、CLIP-170とダイナクチンとの相互作用が強まり、EGFRを含むエンドソームは微小管上にローディングされる。その結果、ダイニンモータータンパク質による逆行輸送が開始される。

管プラス端にリクルートすることで、微小管マイナス端方向への輸送開始に機能していることが考えられた^{7,8)}。我々は質量分析の結果から、LRRK1がCLIP-170のC末端Zn-knucleドメインに存在するThr-1384をリン酸化することを見いだした。CLIP-170のC末端Zn-knucleドメインは、p150^{Glued}との結合に重要なドメインである。興味深いことに、CLIP-170のThr-1384をアラニンに置換した非リン酸化型CLIP-170 T1384Aではp150^{Glued}との結合が弱まり、グルタミン酸に置換したリン酸化模倣型CLIP-170 T1384Eではp150^{Glued}との結合が強まることがわかった。さらに、EGFR細胞内輸送にCLIP-170のリン酸化が重要か検討した結果、LRRK1はCLIP-170のThr-1384をリン酸化することで、EGFRを含むエンドソームの微小管へのローディングおよびダイニン依存的な輸送開始に機能していることが明らかとなった(図2)。LRRK1は直接p150^{Glued}と結合することから、EGFRを含むエンドソームが微小管上にローディングされる前に、ダイニン・ダイナクチン複合体がエンドソーム上にリクルートされている可能性が考えられる(図2, ステップ1)。LRRK1は、伸長してきた微小管の先端に局在するCLIP-170をリン酸化することで、CLIP-170とp150^{Glued}との結合を促進し、結果としてEGFRを含むエンドソームの微小管上へのローディングを促している可能性が考えられる(図2, ステップ2)。微小管にローディングされたダイニン・ダイナクチン複合体はその後、微小管マイナス端方向へと輸送を開始する(図2, ステップ3)。微小管はダイナミックに伸長と退縮を繰り返すことで標的分子を“探索&捕捉”していると考えられており、LRRK1によるCLIP-170のリン酸化は、微小管がEGFRを含むエンドソームを効率よく捕捉するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

3. M期中心体におけるLRRK1の活性化機構

EGFR細胞内輸送の制御に加え、最近我々はM期にLRRK1が紡錘体配向制御に重要なことを明らかにした⁴⁾。細胞が分裂する際、細胞分裂面に並んだ姉妹染色体は紡錘体によって娘細胞に均等に分配される。このとき、紡錘体の傾きが細胞分裂軸の方向を決定することが知られている。細胞分裂軸の方向は、組織の形態形成や非対称分裂、幹細胞の自己増殖などに必須な役割を果たしており、その制御機構は重要である⁹⁾。最近、京都大学豊島文子博士らが行った紡錘体配向を制御するキナーゼの網羅的なスクリーニングから、候補キナーゼの一つとしてLRRK1が同定された¹⁰⁾。そこで、M期紡錘体配向制御におけるLRRK1の機能について解析を進めた。

まず、LRRK1の細胞内における局在および活性化を検討した。LRRK1は、キナーゼドメイン内の1400番目のトレオニン [Thr-1400, 我々のクローンはデータベースに登録されているもの (NM_024652) より27アミノ酸短い] がリン酸化されると活性化する。そこで、この部位に対するリン酸化抗体を作製し、LRRK1がいつどこで活性化しているのか検討した。その結果、LRRK1は細胞周期を通して中心体に局在し、M期に中心体で強く活性化していることが明らかとなった。興味深いことに、LRRK1のThr-1400の周辺配列は、M期キナーゼCDK1 (cyclin-dependent kinase 1) のリン酸化コンセンサス配列と一致していた。CDK1は、CyclinBによってG2-M期中心体で活性化し、M期進行に必須なキナーゼである。我々はCDK1がLRRK1のThr-1400を直接リン酸化し、M期中心体におけるLRRK1の活性化に重要なことを明らかにした。

4. PLK1はLRRK1のリン酸化を介して紡錘体配向を制御している

紡錘体配向を制御するキナーゼの網羅的なスクリーニングでは、LRRK1とともにPLK1 (polo-like kinase 1) も候補キナーゼとして同定されていた¹⁰⁾。PLK1はCDK1と同様M期進行に必須なキナーゼで、さまざまな基質をリン酸化し中心体成熟や染色体分離、細胞質分裂(サイトキネシス)に重要な役割を果たしている¹¹⁾。そこで、LRRK1とPLK1が同じ経路で紡錘体配向を制御している可能性について検討を行った。まず、LRRK1とPLK1が相互作用するか検討した結果、PLK1はPolo-boxドメイン依存的にLRRK1と結合することを見いだした。さらに、PLK1はLRRK1のSer-1790をリン酸化し、LRRK1の活性化に必須な役割を果たしていた。LRRK1 Ser-1790をアラニンに置換した非リン酸化型LRRK1 S1790Aは、M期に活性化が起きない。一方、Ser-1790をアスパラギン酸に置換したり

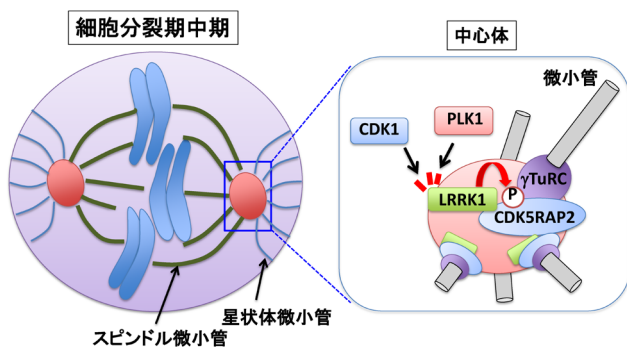


図3 M期中心体におけるLRRK1の機能

M期中心体に局在したLRRK1は、PLK1およびCDK1によってリン酸化され活性化する。活性化したLRRK1は中心体成熟に重要なCDK5RAP2をリン酸化し、CDK5RAP2による γ TuRCの活性化を促進する。その結果、中心体から星状体微小管が形成され、紡錘体配向が適切に制御される。(新着論文レビュー2015 花房 洋・松本邦弘 Licensed under CC表示2.1日本)

ン酸化模倣型LRRK1 S1790Dでは、PLK1の活性を阻害した細胞でもM期にLRRK1の活性化が観察された。これらの結果から、LRRK1はPLK1によるSer-1790のリン酸化依存的に活性化していることが明らかとなった。すなわち、LRRK1のM期中心体での活性化には、PLK1とCDK1という二つのM期キナーゼによる連続的なリン酸化が必要であった(図3)。

次に、LRRK1がM期紡錘体配向制御に重要なか、siRNAを用いて検討した。スクリーニングの結果と一致するように、LRRK1をノックダウンした細胞では紡錘体の傾きがランダムになった。このとき、siRNA耐性の野生型LRRK1を発現させると紡錘体配向異常がレスキューされたが、キナーゼ不活性型LRRK1ではレスキューされなかった。このことから、LRRK1のキナーゼ活性が紡錘体配向の制御に重要なことがわかる。さらに、LRRK1がPLK1の下流で紡錘体配向を制御しているか検討した。PLK1の特異的阻害剤であるBI 2536で細胞を処理すると、M期紡錘体配向が異常になる。ここに、リン酸化模倣型LRRK1 S1790Dを発現させると、この異常がレスキューされた。一方、非リン酸化型LRRK1 S1790Aではこのようなレスキューはみられなかった。以上の結果は、LRRK1がPLK1の下流で、Ser-1790のリン酸化依存的に紡錘体配向を制御していることを示している。

5. LRRK1は中心体構成因子CDK5RAP2をリン酸化し、 γ TuRCの活性化を促進する

紡錘体の配向は、中心体から伸びた星状体微小管と細胞膜との相互作用によって制御されている。興味深いことに、LRRK1をノックダウンした細胞では、星状体微小管

の形成が貧弱になっていた。星状体微小管の形成は、中心体からの微小管の形成(微小管nucleation)活性に依存することから、LRRK1がこの活性に重要なか検討した。その結果、LRRK1をノックダウンした細胞ではコントロールの細胞に比べ、中心体からの微小管nucleation活性が顕著に低下していることが明らかとなった。このように、LRRK1は中心体の微小管nucleation活性を促進することで星状体微小管の形成を促し、その結果、紡錘体配向を制御していると考えられる。

次に、LRRK1の中心体における基質を探索した。中心体に局在し微小管nucleation活性に重要なことが知られているタンパク質の中に、LRRK1がリン酸化する基質がないか*in vitro*キナーゼアッセイを行い検討したところ、LRRK1は中心体構成因子CDK5RAP2をリン酸化することを見いだした。CDK5RAP2はショウジョウバエCentrosominのホモログで、種を超えて中心体成熟に重要な因子である。CDK5RAP2はN末端にCM1モチーフ、C末端にCM2モチーフという保存された二つのモチーフを持ち、CM1モチーフは γ TuRCとの結合に、CM2モチーフは中心体への局在に重要である¹²⁾。 γ TuRCは γ -tubulinを含む複合体で、微小管のnucleationに必須な複合体である。興味深いことに、LRRK1は、CDK5RAP2のCM1モチーフ近傍のSer-140をリン酸化していた。そこで、LRRK1がCDK5RAP2と γ TuRCとの結合に重要なか検討した結果、LRRK1はSer-140をリン酸化することで、CDK5RAP2と γ -tubulinとの結合を促進していることが明らかとなった。

これまでの精製タンパク質を用いた*in vitro*の実験から、CDK5RAP2は γ TuRCと結合することで γ TuRCの構造変化を引き起こし、 γ TuRCによる微小管のnucleationを促進するというモデルが提唱されていた¹³⁾。LRRK1がCDK5RAP2をリン酸化し γ -tubulinとの結合を促進していたことから、LRRK1によるCDK5RAP2のリン酸化が γ TuRCによる微小管nucleation活性に機能していないか、CDK5RAP2 N末端フラグメント(51~200アミノ酸)を用いて検討した。CDK5RAP2 N末端フラグメント(51~200アミノ酸)は、CM1モチーフは持つがCM2モチーフを欠くため、中心体には局在できない。実際U2OS細胞にこのフラグメントを発現させると、細胞質で γ TuRCを活性化し異所的な微小管のnucleationを引き起こす。LRRK1をノックダウンした細胞では、CDK5RAP2(51~200)による異所的な微小管のnucleationが低下することが明らかとなった。また、LRRK1によるリン酸化部位に変異を導入したCDK5RAP2(51~200) S140Aを発現させると、野生型に比べ微小管nucleationが低下していた。これに対し、リン酸化模倣型CDK5RAP2(51~200) S140Eを発現させると、微小管nucleation活性が増加した。以上の結果から、LRRK1はCDK5RAP2のSer-140をリン酸化することで、CDK5RAP2

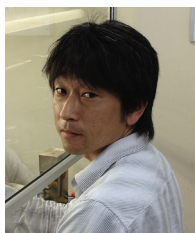
と γ TuRCとの結合を促進し、その結果、 γ TuRCの構造変化/活性化を引き起こしていると考えられる。細胞質に存在する γ TuRCの大部分は不活性な状態に維持されており、G2期からM期にかけ中心体へリクルートされると活性化することが知られている。LRRK1は γ TuRCの中心体へのリクルートには関与せず、中心体における活性化のステップに機能している可能性が考えられる。

6. おわりに

LRRK1は、パーキンソン病原因遺伝子LRRK2とともに、ROCOファミリーキナーゼに属する。これまで、ROCOファミリーキナーゼを活性化する上流因子やROCOファミリーキナーゼの生理的な基質は不明であった。我々は、LRRK1の基質としてCLIP-170およびCDK5RAP2を同定し、それぞれの分子がEGFRを含むエンドソームのダイニン依存的な輸送の開始と、M期中心体の微小管nucleation活性に機能していることを明らかにした。また、LRRK1はM期キナーゼPLK1およびCDK1による連続的なリン酸化によって活性化していることも明らかとなった。このようにROCOファミリーキナーゼで初めて生理的な基質の同定とその作用機構を明らかにすることができた。LRRK1はLRRK2とヘテロ二量体を形成することから、一部重複して機能している可能性が考えられている¹⁴⁾。しかし、今回明らかになった機能に関してはLRRK1特異的であり、LRRK2は関与していないと思われる。今後は、LRRK2に関しても生理的な基質の同定および活性化因子の同定が機能解明に重要と思われる。

著者寸描

●花房 洋 (はなふさ ひろし)



名古屋大学大学院理学研究科准教授。理学博士。

■略歴 1973年兵庫県に生る。2001年京都大学大学院理学研究科博士課程修了。同年日本学術振興会特別研究員。02年名古屋大学大学院理学研究科助手、07年同助教、13年同講師、15年より同准教授。

■研究テーマと抱負 シグナル伝達機構の解明を中心に、細胞内で起こっている

現象を解析。自分を構成する細胞で同じことが起こっていることを感じながら、生命の不思議に触れていたい。

■趣味 テニス、水泳、草野球、大リーグTV観戦。

文 献

- 1) Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A., & Matsumoto, K. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 158.
- 2) Ishikawa, K., Nara, A., Matsumoto, K., & Hanafusa, H. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1294–1206.
- 3) Kedashiro, S., Pastuhov, S.I., Nishioka, T., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Matsumoto, K., & Hanafusa, H. (2015) *J. Cell Sci.*, **128**, 385–396.
- 4) Hanafusa, H., Kedashiro, S., Tezuka, M., Funatsu, M., Usami, S., Toyoshima, F., & Matsumoto, K. (2015) *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1024–1035.
- 5) Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E., & Kreis, T.E. (1992) *Cell*, **70**, 887–900.
- 6) Kardon, J.R. & Vale, R.D. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 854–865.
- 7) Lloyd, T.E., Machamer, J., O'Hara, K., Kim, J.H., Collins, S.E., Wong, M.Y., Sahin, B., Imlach, W., Yang, Y., Levitan, E.S., McCabe, B.D., & Kolodkin, A.L. (2012) *Neuron*, **74**, 344–360.
- 8) Lomakin, A.J., Semenova, I., Zaliapin, I., Kraikivski, P., Nadezhdina, E., Slepchenko, B.M., Akhmanova, A., & Rodionov, V. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 323–333.
- 9) Knoblich, J.A. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 849–860.
- 10) Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., & Toyoshima, F. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 626.
- 11) Archambault, V. & Glover, D.M. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 265–275.
- 12) Wang, Z., Wu, T., Shi, L., Zhang, L., Zheng, W., Qu, J.Y., Niu, R., & Qi, R.Z. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 22658–22665.
- 13) Choi, Y.-K., Liu, P., Sze, S.K., Dai, C., & Qi, R.Z. (2010) *J. Cell Biol.*, **191**, 1089–1095.
- 14) Langston, R.G., Rudenko, I.N., & Cookson, M.R. (2016) *Biochem. J.*, **473**, 221–232.