

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02612

研究課題名(和文) ROCOファミリーキナーゼLRRK1/2によるメンブレントラフィック制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of membrane traffic by ROCO family kinase LRRK1/2

研究代表者

花房 洋 (Hanafusa, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00345844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主にLRRK1に焦点を当て(1)EGFR細胞内トラフィックにおける機能解析及び(2)損傷ミトコンドリア除去機構(マイトファジー)における機能解析を行なった。(1)に関して、LRRK1とフォスファターゼPTENは、低分子量GタンパクRab7をリン酸化・脱リン酸化することでEGFR細胞内輸送を制御することを明らかにした。(2)に関して、LRRK1はULK1によってリン酸化・活性化され、損傷ミトコンドリア上のRab7をリン酸化することで、隔離膜形成に重要なATG9をリクルートすることを明らかにした。またLRRK1は、LRRK2と競合的にマイトファジーを制御する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の癌化メカニズムの解明や、パーキンソン病など脳変性疾患の発症メカニズムの解明は、高齢化社会にある日本において喫緊の課題である。本研究からLRRK1-Rab7経路によるEGFRリソソーム分解機構の一端が明らかとなり、細胞癌化の理解に貢献できた。またパーキンソン病発症に重要と考えられているマイトファジーに関し、LRRK1がParkin依存的な損傷ミトコンドリア除去に必須であることを明らかにした。本研究成果は、マイトファジーの新たな一面を明らかにしただけでなく、LRRK2によるマイトファジー制御にも新たな視点を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the function of LRRK1 in (1) EGFR intracellular trafficking and (2) mitophagy, a selective autophagy to remove damaged mitochondria. Regarding (1), we found that LRRK1 and the phosphatase PTEN regulate EGFR intracellular trafficking by phosphorylating and dephosphorylating small G protein Rab7, respectively. Regarding (2), LRRK1 is phosphorylated and activated by ULK1, which phosphorylates Rab7 on damaged mitochondria and recruits ATG9, an important factor for the formation of isolation membrane. We also found that LRRK1 may competitively regulate mitophagy with LRRK2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：LRRK1 EGFR Mitophagy Rab7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、アルツハイマー病に次いで患者の多い脳神経変性疾患である。これまで LRRK2 や Parkin など家族性原因遺伝子がいくつか同定され、パーキンソン病発症機構の解明が進められてきた。しかし発症機構については未だ不明な点が多い。LRRK2 変異は、家族性及び孤発性パーキンソン病患者で最もよく見られる変異である。パーキンソン病患者の脳ではオートファジーの欠損による不溶性タンパク質の蓄積が生じ、特にドパミン産生細胞でアポトーシスが誘発される。これまで LRRK2 変異体を発現させた細胞ではオートファジーが不全となり、リソソームでのタンパク質分解が阻害されることが明らかとなっている。また LRRK2 がシナプス小胞の輸送などメンブレントラフィックに機能していることも報告されていた。しかしその作用機構については不明なままである。パーキンソン病患者で見られる LRRK2 の変異のほとんどが、細胞内で LRRK2 のキナーゼ活性を上昇させることから、基質の同定が重要なステップであった。2016年に報告された網羅的なリン酸化プロテオミクス解析から、LRRK2 が Rab ファミリー (Rab3a, Rab8a, Rab10, Rab12) をリン酸化することが明らかとなり、ようやくメンブレントラフィックやオートファジーに関連する生理的に重要な基質が同定された。一方申請者は LRRK2 ファミリー分子である LRRK1 の機能解析を通して、LRRK1 が活性化した EGFR を含むエンドソームの輸送・成熟に機能していることを明らかにしてきた。さらに LRRK1 がオートファゴソームの成熟に重要なこと、質量分析を用いた解析から LRRK1 と LRRK2 が共通の分子群と相互作用することを見出していた。また LRRK1 の基質を探索する過程で、Rab7 を同定した。興味深いことに LRRK1 による Rab7 のリン酸化部位は、LRRK2 による Rab3a, Rab8a, Rab10, Rab12 のリン酸化部位と同じ Switch II 領域 (エフェクター分子との結合に重要な領域) に存在する保存されたアミノ酸であった。これらのことから、LRRK1/LRRK2 は、Rab ファミリーのリン酸化を通して、メンブレントラフィックを制御している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、LRRK1/LRRK2 による Rab ファミリーを介したメンブレントラフィック制御機構の解明を目指した。特に申請者自身の予備的データに基づいて、主に LRRK1 に焦点を当て、(1) EGFR 細胞内トラフィックにおける LRRK1 の機能解析、(2) 損傷ミトコンドリア除去機構 (マイトファジー) における LRRK1/LRRK2 の機能解析、の2点について、Rab のリン酸化を介した制御機構の解明を行なった。

3. 研究の方法

(1) EGFR 細胞内トラフィックにおける LRRK1 の機能解析

これまで我々は、LRRK1 が活性化した EGFR と複合体を形成し、共にエンドサイトーシスされたのち、EGFR を含むエンドソームのリソソームへの輸送を制御していることを明らかにしてきた。またその過程で LRRK1 は、微小管プラス端結合分子 CLIP170 や、低分子量 G タンパク質 Rab7 をリン酸化し、微小管上のダイニン依存的な輸送を促進することを明らかにしていた。しかし、Rab7 による制御機構については不明な点が多かった。そこで LRRK1 による Rab7 のリン酸化の役割について検討した。まず同定したリン酸化部位 (Ser-72) に対するリン酸化抗体を作製し、EGFR 細胞内トラフィックの過程で、いつどこでリン酸化されているか検討した。さらに、リン酸化の重要性を検討するため、非リン酸化変異体 Rab7 S72A と、リン酸化模倣型変異体 Rab7 S72D を作製し、EGFR トラフィックにおける Rab7 リン酸化の効果を検討した。また、Rab7 リン酸化の役割を明らかにするため、リン酸化によってエフェクター分子との相互作用が変化するか、共免疫沈降法やプルダウン法を用いて検討した。

(2) 損傷ミトコンドリア除去機構 (マイトファジー) における LRRK1/LRRK2 の機能解析

これまでの研究から、LRRK2 や Parkin が選択的オートファジーの一つ、マイトファジーに重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。マイトファジーの欠損は、パーキンソン病発症に重要と考えられている。最近 Parkin 依存的なマイトファジーに、Rab7 が重要なことが報告された。Rab7 は損傷を受けたミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア除去に重要な働きをしていることが明らかとなった。しかし、Rab7 の作用機序や、活性制御機構については不明なままであった。我々は LRRK1 が Rab7 Ser-72 をリン酸化することを見出していたため、LRRK1-Rab7 経路がマイトファジーにおいても重要か検討した。まず LRRK1 自身がマイトファジーに必要か、U20S 細胞 (内在性 Parkin を欠失) に Parkin を発現させ検討した。さらに LRRK1 のキナーゼ活性がマイトファジーに重要か、キナーゼ不活性型 LRRK1 を用いたレスキュー実験を行い検討した。さらに損傷ミトコンドリアにおける LRRK1 キナーゼ活性の制御機構の解明や、LRRK1 による Rab7 の Ser-72 リン酸化の重要性について、Rab7 リン酸化抗体を用いた生化学的実験や、細胞染色によって検討した。マイトファジーでは、損傷ミトコンドリアを隔離膜と呼ばれる脂質 2 重膜で覆い (マイトファゴソーム) 最終的にリソソームと融合することでミトコンドリアを分解することが知られている。そこで LRRK1-Rab7 経路が、マイトファジーのどのステップに重

要か検討した。これらの検討には、マイトファジー開始に重要な ULK1 複合体との関係や、隔離膜形成に重要な ATG9、LC3 などの分子との関係を検討した。さらに LRRK1 と LRRK2 のマイトファジー制御における関係についても解析を行なった。

4. 研究成果

(1) EGFR 細胞内トラフィックにおける LRRK1 の機能解析

本研究から、(i) EGFR と共にエンドサイトーシスされた LRRK1 は、Rab7 Ser-72 をリン酸化し、Rab7 のエンドソーム局在を促進すること、(ii) リン酸化された Rab7 は、エファクター分子 RILP との結合が促進され、ダイニンモータータンパク質をリクルートすること、(iii) LRRK1 による Rab7 Ser-72 リン酸化は、EGFR を含むエンドソームのリソソームへの輸送に重要なこと、を明らかにした。最近、フォスファターゼ PTEN が Rab7 Ser-72 を脱リン酸化することが報告された。そこで Rab7 のエンドソーム局在を指標に、LRRK1 と PTEN との関係について解析を行なった。siRNA を用いて PTEN をノックダウンしたところ、EGFR を含むエンドソームへの Rab7 の局在が顕著に増加した。これは Rab7 のリン酸化が亢進された結果と考えられた。この考えと一致するように、PTEN と LRRK1 を同時にノックダウンすると、Rab7 の EGFR 含有エンドソームへの局在がほとんどみられなくなった。以上のことから、LRRK1 による Rab7 の Ser-72 リン酸化が、Rab7 のエンドソーム局在に必須であるとともに、LRRK1 が Rab7 Ser-72 のキナーゼ・PTEN が Rab7 Ser-72 のフォスファターゼとして、それぞれ機能していることが明らかとなった。本研究から、EGFR を含むエンドソームのダイニン依存的なリソソームへの輸送は、LRRK1 と PTEN による Rab7 のリン酸化・脱リン酸化によって厳密に制御されていることが明らかとなった。

(2) 損傷ミトコンドリア除去機構 (マイトファジー) における LRRK1/LRRK2 の機能解析

LRRK1 が Parkin 依存的なマイトファジーに重要か、siRNA を用いたノックダウンを行い検討した。Parkin を発現させた U2OS 細胞を、ミトコンドリア脱分極剤で処理すると、Parkin が損傷ミトコンドリアに局在し、その後マイトファジーにより損傷ミトコンドリアが除去される。この時、LRRK1 をノックダウンすると、ミトコンドリア損傷依存的な Parkin の局在には影響しなかったものの、損傷ミトコンドリアの除去は阻害された。このことから、LRRK1 は Parkin の下流でマイトファジーに重要なことが明らかとなった。さらにキナーゼ活性が重要か、野生型及びキナーゼ不活性型 LRRK1 によるレスキュー実験を行なったところ、LRRK1 は、キナーゼ活性依存的に損傷ミトコンドリアを除去することが明らかとなった。また Rab7 に対するリン酸化抗体を用いた実験から、LRRK1 が損傷ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 をリン酸化することが明らかとなった。また LRRK1 は、ミトコンドリアの損傷依存的に活性化することも確認された。そこで次に、マイトファジーにおける LRRK1 の活性化機構について検討した。マイトファジーでは、Parkin の下流で ULK1 複合体が損傷ミトコンドリアに局在し、オートファジー開始に重要な ULK1 キナーゼが活性化することが知られている。我々は、ULK1 をノックダウンした細胞で、損傷ミトコンドリアにおける Rab7 Ser-72 リン酸化が消失することを見出した。またこの時、恒常活性型 LRRK1 を発現させると、これがレスキューされた。このことから、LRRK1 は ULK1 の下流で機能していることが明らかとなった。さらに ULK1 は LRRK1 を直接リン酸化し、LRRK1 の活性化に重要なことも明らかにした。また LRRK1 は、ULK1 複合体構成因子 ATG13 とミトコンドリアの損傷依存的に結合し、LRRK1 の損傷ミトコンドリア局在に重要なことを明らかにした。さらに LRRK1 による Rab7 Ser-72 のリン酸化は、損傷ミトコンドリアへの ATG9 のリクルートに重要なことも見出した。以上の結果から、マイトファジー時に、ULK1 によって活性化された LRRK1 は、損傷ミトコンドリア上で Rab7 Ser-72 をリン酸化し、ATG9 をリクルートすることで隔離膜形成に機能している可能性を明らかにした。またプレリミナリーな実験結果から、LRRK2 は、マイトファジー活性に対し、LRRK1 とは逆に抑制的に機能している可能性を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hanafusa Hiroshi, Yagi Takuya, Ikeda Haruka, Hisamoto Naoki, Nishioka Tomoki, Kaibuchi Kozo, Shirakabe Kyoko, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 132
2. 論文標題 LRRK1 phosphorylation of Rab7 at S72 links trafficking of EGFR-containing endosomes to its effector RILP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs228809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.228809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Yoshiki, Hanafusa Hiroshi, Pastuhov Strahil Iv, Shimizu Tatsuhiro, Li Chun, Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 TDP 2 negatively regulates axon regeneration by inducing SUMOylation of an Ets transcription factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e47517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201847517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisamoto Naoki, Shimizu Tatsuhiro, Asai Kazuma, Sakai Yoshiki, Pastuhov Strahil I., Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 39
2. 論文標題 C. elegans Tensin Promotes Axon Regeneration by Linking the Met-like SVH-2 and Integrin Signaling Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5662 ~ 5672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2059-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisamoto Naoki, Tsuge Anna, Pastuhov Strahil Iv., Shimizu Tatsuhiro, Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Phosphatidylserine exposure mediated by ABC transporter activates the integrin signaling pathway promoting axon regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05478-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Yoshiki, Hanafusa Hiroshi, Shimizu Tatsuhiro, Pastuhov Strahil I., Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 BRCA1?BARD1 Regulates Axon Regeneration in Concert with the Gq ?DAG Signaling Network	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2842 ~ 2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1806-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Yoshiki, Tsunekawa Mayuka, Ohta Kohei, Shimizu Tatsuhiro, Pastuhov Strahil Iv., Hanafusa Hiroshi, Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 The integrin signaling network promotes axon regeneration via the Src?ephexin?RhoA GTPase signaling axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 JN ~ RM-2456-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2456-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hisamoto Naoki, Sakai Yoshiki, Ohta Kohei, Shimizu Tatsuhiro, Li Chun, Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 CDK14 Promotes Axon Regeneration by Regulating the Noncanonical Wnt Signaling Pathway in a Kinase-Independent Manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8309 ~ 8320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0711-21.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Tatsuhiro, Pastuhov Strahil I., Hanafusa Hiroshi, Sakai Yoshiki, Todoroki Yasuko, Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 <i>Caenorhabditis elegans</i> F-Box Protein Promotes Axon Regeneration by Inducing Degradation of the Mad Transcription Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2373 ~ 2381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1024-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Tatsuhiro、Pastuhov Strahil Iv.、Hanafusa Hiroshi、Matsumoto Kunihiro、Hisamoto Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 The C. ?elegans BRCA2-ALP/Enigma Complex Regulates Axon Regeneration via a Rho GTPase-ROCK-MLC Phosphorylation Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1880 ~ 1889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 花房洋
2. 発表標題 小胞体-エンドソームコンタクトサイトにおける
3. 学会等名 蛋白質科学会・細胞生物学会合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花房洋、八木拓也、西岡朋生、貝淵弘三、白壁恭子、松本邦弘
2. 発表標題 LRRK1はRab7 Ser-72をリン酸化し、エフェクター分子RILPによるEGFR含有エンドソームの輸送を促進する
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花房洋
2. 発表標題 LRRK1によるエンドソームから発信されるEGFRシグナルの制御
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花房洋
2. 発表標題 小胞体-エンドソームコンタクトサイトにおける
3. 学会等名 蛋白質科学会・細胞生物学会合同年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花房洋、八木拓也、西岡朋生、貝淵弘三、白壁恭子、松本邦弘
2. 発表標題 LRRK1はRab7 Ser-72をリン酸化し、エフェクター分子RILPによるEGFR含有エンドソームの輸送を促進する
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------